

„Bedeutung von TGF-beta/ Smad-Signaltransduktion und
Reepithelialisierung für die heilungs-assoziierte
Kontraktion cutaner Wunden.“

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae dentariae (Dr. med. dent.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von Kristin Glagla

geboren am 13.01.1986 in Schwerin

Gutachter

1. Prof. Dr. Dr. Stefan Schultze-Mosgau, Jena
2. Prof. Dr. med. habil. Utz Settmacher, Jena
3. PD Dr. Dr. Michael Thorwarth, München

Tag der öffentlichen Verteidigung: 06. Dezember 2011

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------------------------------|---|
| ABC | <i>Avidin-Biotin-Complex</i> |
| Aqua dest. | <i>aqua destillata</i> |
| bFGF | <i>basic fibroblast growth factor</i> |
| CaCl ₂ | <i>Kalziumchlorid</i> |
| DAB | <i>Diaminobenzidin</i> |
| DNA | <i>Desoxyribonukleinsäure</i> |
| EGF | <i>epidermal growth factor</i> |
| EZM | <i>extrazelluläre Matrix</i> |
| FGF | <i>fibroblast growth factor</i> |
| HE | <i>Hämatoxylin-Eosin</i> |
| H ₂ O ₂ | <i>Wasserstoffperoxid</i> |
| HRP | <i>horseradish peroxidase (Meerrettichperoxidase)</i> |
| IL | <i>Interleukin</i> |
| I-Smad | <i>Inhibitory-Smad</i> |
| KGF | <i>keratinocyte growth factor</i> |
| KO | <i>knock out</i> |
| LI | <i>Labeling-Index</i> |
| NaCl ₂ | <i>Natriumchlorid</i> |

| | |
|--------|--|
| Op | <i>Operation</i> |
| p | <i>Wahrscheinlichkeit</i> |
| PDGF | <i>platelet derived growth factor</i> |
| RNA | <i>Ribonukleinsäure</i> |
| R-Smad | <i>receptor- activated Smad</i> |
| SMA | <i>smooth muscle actin</i> |
| Smad | <i>Mothers against decapentaplegic homolog</i> |
| TGF | <i>transforming growth factor</i> |
| Tris | <i>Tris (hydroxymethyl)-aminomethan</i> |
| VEGF | <i>vascular endothelial growth factor</i> |
| WH | <i>Wundheilung</i> |

Inhalt

| | | |
|-------|---|----|
| 1 | Zusammenfassung | 1 |
| 2 | Einleitung..... | 3 |
| 2.1 | Klinische Bedeutung sekundärer Wundheilung | 3 |
| 2.2 | Physiologische Wundheilung | 3 |
| 2.3 | Rolle der Myofibroblasten hinsichtlich der sekundären Wundheilung | 5 |
| 3 | Zielsetzung der vorliegenden Arbeit..... | 7 |
| 4 | Material..... | 8 |
| 4.1 | Versuchstiere..... | 8 |
| 4.2 | Geräte | 8 |
| 4.3 | Verbrauchsartikel und Chemikalien | 9 |
| 4.4 | Material Immunhistochemie | 10 |
| 4.5 | Lösungen..... | 11 |
| 5 | Methode | 12 |
| 5.1 | Gewinnung der Proben | 12 |
| 5.2 | Fixierung und Einbettung | 13 |
| 5.3 | Herstellung von Schnittpräparaten..... | 13 |
| 5.4 | Hämatoxylin- Eosin- Färbung | 13 |
| 5.5 | Immunhistochemie..... | 14 |
| 5.6 | Auswertung der Färbungen | 17 |
| 5.6.1 | HE-Färbung..... | 17 |
| 5.6.2 | Immunhistochemie..... | 18 |
| 5.6.3 | Statistische Auswertung | 18 |
| 6 | Ergebnisse..... | 20 |
| 6.1 | Untersuchten Parameter..... | 20 |
| 6.1.1 | Wundbreite und Epithelialisierungsgrad..... | 20 |
| 6.1.2 | Smad 2/3 | 25 |
| 6.1.3 | Smad 7 | 29 |
| 6.2 | Auswertung..... | 32 |
| 6.2.1 | Fragestellung 1 | 32 |
| 6.2.2 | Fragestellung 2..... | 34 |
| 6.2.3 | Fragestellung 3..... | 35 |

| | | |
|-------|---------------------------------------|----|
| 6.2.4 | Fragestellung 4..... | 38 |
| 6.2.5 | Fragestellung 5..... | 40 |
| 7 | Diskussion | 42 |
| 7.1 | Interpretation der Ergebnisse..... | 42 |
| 7.2 | Methodenkritik | 46 |
| 8 | Schlussfolgerungen und Ausblick | 48 |
| | Quellen | I |
| | Lebenslauf | IV |
| | Danksagung | V |
| | Ehrenwörtliche Erklärung | VI |

1 Zusammenfassung

Die Wundheilung stellt einen elementaren Mechanismus für das Überleben des menschlichen Organismus dar. Nach Verletzung eines Gewebes wäre es wünschenswert, dass in jedem Fall eine Regeneration des Defektes durch gleichwertigen Gewebeersatz erfolgt d.h. eine narbenlose Abheilung. Da fibrotische Veränderungen mit einer übersteigerten Myofibroblastenfunktion in Zusammenhang stehen, war in der gegenwärtigen Studie von primärem Interesse, inwieweit die heilungsassoziierte Wundkontraktion von der Funktion TGF-betas und der Reepithelialisierung beeinflusst wird. Die Aktivität von TGF-beta wurde indirekt über dessen intrazelluläre Mediatoren Smad2/3 und Smad7 ermittelt. Weiterhin wurde überprüft, ob Unterschiede im Expressionsprofil der Smad-Proteine zwischen primären und sekundären Wundheilungsmodell existieren. Im Rahmen vorliegender Studie wurden 55 Mäuse des Inzucht-Stammes C57/BL6 Jax verwendet. Es wurden 2 Exzisionswunden definierter Größe in der Leistenregion gesetzt. Die dabei gewonnene Haut diente der Etablierung eines Kontrollstandards. Eine der Wunden wurde der freien Granulation überlassen (sekundäre Wundheilung), während die andere Seite mit 3 Einzelknopfnähten verschlossen wurde (primäre Wundheilung). Nach 3, 7, 14, 22 und 28 Tagen erfolgte aus beiden Wundbereichen die Probenentnahme. Der Nachweis der Smad2/3- und Smad7-Proteine gelang mittels der ABC (Avidin-Biotin-Komplex)-Methode und zur anschließenden Quantifizierung diente der Labeling-Index. Alle Proben wurden Hämatoxylin-Eosin gefärbt und im Anschluss histomorphometrisch vermessen um das Ausmaß der Wundkontraktion und der Epithelialisierung zu ermitteln. Anhand der vorliegenden Ergebnisse konnte nachgewiesen werden, dass die Smad2/3- und die Smad7-Aktivität in beiden Wundheilungsmodellen an Tag 3, 7 und 14 signifikant höher ($p \leq 0,05$) ist als die der Kontrollhäute. Außerdem konnte gezeigt werden, dass ein hoher TGF-beta-Spiegel die Wundkontraktion fördert. Eine Senkung der TGF-beta-Aktivität führte hingegen zur Steigerung der Reepithelialisierung. Die Ausbildung der Epitheldecke inhibierte eine weitere Myofibroblastentätigkeit und die Wundkontraktion stagnierte. Signifikante Unterschiede zwischen der primären und sekundären Wundheilung bzgl. des Expressionsprofils der Smad-Proteine und der Epithelialisierung waren

nicht nachweisbar. Lediglich an Tag 7 konnte ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Heilungsvarianten in Hinblick auf die Wundbreite belegt werden. Die Ergebnisse zeigen, dass die Betrachtung der TGF-beta-Aktivität für die Entwicklung einer antifibrotischen Therapie unerlässlich ist.

2 Einleitung

2.1 Klinische Bedeutung sekundärer Wundheilung

Grundsätzlich gibt es zwei Arten von Wundheilungsstörungen: die verzögerte Wundheilung, die vorrangig Patienten mit Radatio, Immunsuppression und Vorerkrankungen wie Diabetes betrifft und die überschießende Wundheilung, die mit der Ausbildung von breiten fibrotischen Narben einhergeht. Letztere treten auf, wenn man nicht entlang der Langer'schen Hautlinien schneidet, bei Patienten mit genetischer Prädisposition oder bei großen der freien Granulation überlassenden Wunden, wie z.B. bei Verbrennungen, eitrig-infizierten oder unter Spannung stehenden Wunden. Die Patienten klagen häufig über die mangelhafte Ästhetik, Schmerzen und Spannungsgefühle. Besonders Verbrennungsoffer leiden zusätzlich unter dem limitierten Bewegungsradius der Gelenke und Wachstums-einschränkungen. Auch intraorale Defekte mit freiliegendem Periost, wie sie z.B. nach Vestibulumplastiken entstehen, neigen wenn man sie der sekundären Epithelialisierung überlässt zu Gewebeschrumpfung und führen häufig zu Rezidiven. Aus diesem Grund sind offene Vestibulumplastiken heute obsolet und die Defekte werden mit Spalthaut oder freien Transplantaten der Wangen- bzw. Gaumenschleimhaut gedeckt. Diese freien Transplantate sind allerdings nur begrenzt verfügbar und können ästhetisch unbefriedigend ausfallen. Um großflächige Wunden zu decken, werden daher aus gesunden Körperregionen sogenannte „mesh-grafts“ generiert. Weitere Möglichkeiten Heilungsdefizite zu therapieren stellen das „Tissue Engineering“ oder die topische Applikation von zytokinhaltigen Medikamenten (z.B. Becaplermin) dar (Wieman et al. 1998).

2.2 Physiologische Wundheilung

Die Wundheilung umfasst alle physiologischen Vorgänge zur Rekonstruktion zerstörten Gewebes, die insbesondere durch Neubildung von Bindegewebe und Blutgefäßen den Verschluss einer Wunde bewirken. Ziel ist die vollständige Wiederherstellung von Integrität und Funktionalität der Haut. Die primäre

Wundheilung (*Sanatio per primam intentionem*) findet bei sauberen, gut durchbluteten Wundrändern statt, die durch Nähte aneinander adaptiert wurden. Es erfolgt ein rascher komplikationsloser Verschluss mit minimaler Bindegewebeneubildung und folglich mit geringer Narbenentstehung. Bei Wundinfektionen oder weit klaffenden Wundrändern heilt die Wunde sekundär (*Sanatio per secundam intentionem*). Der Defekt wird in diesem Fall mit Granulationsgewebe aufgefüllt und es bilden sich breite fibrotische Narben aus. Die physiologische Wundheilung gliedert sich allgemein in drei verschiedene Phasen, die sich teilweise überschneiden.

1. Inflammatorische Phase
2. Proliferative Phase
3. Regenerative Phase

Während der Entzündungsphase kommt es nach Verletzung der Kutis durch exogene Aktivierung der Gerinnungskaskade zur Bildung eines Fibrinpfropfes. Dieser stoppt die Blutung, schützt die offene Wundfläche vor Verunreinigungen und dient migrierenden Zellen als provisorische Matrix. Bakterienprodukte, Komplementaktivierung und Plättchendegranulation ziehen in der frühen Entzündungsphase primär neutrophile Granulozyten an, die durch Proteinasen und andere Enzyme Infektionen verhindern (Werner und Grose 2003). Nach 48-72 Stunden dominieren Makrophagen das histologische Bild der Wunde. Sie sind in der Lage Glykoproteine zu sezernieren, die die Produktion und Organisation von Extrazellulärmatrix sowie die Proliferation von Endothel- und Muskelzellen regulieren (Singer und Clark 1999). In der Proliferationsphase, die sich vom 2.-10. Tag nach Verletzung erstreckt, migrieren basale Keratinozyten in die Wunde. Aktiviert durch EGF, TGF und KGF bedecken die Keratinozyten den Wundbereich und bilden ein neues mehrschichtiges Plattenepithel aus (Martin 1997, Singer und Clark 1999). Zeitgleich teilen sich die Fibroblasten im Bereich der Wundränder, aktiviert durch PDGF, TGF-beta 1 und FGF (Schaffer und Becker 1999). Sie wandern in den traumatisierten Bereich ein und produzieren Extrazellulärmatrix wie Fibronectin und Kollagen vom Typ 1 und 3. Zusätzlich fördern die Faktoren VEGF und bFGF das Einsprossen neuer Blutgefäße in das Wundgebiet (Sunderkotter et al. 1994). Die Fibrinmatrix wird in dieser Phase der Wundheilung

durch Granulationsgewebe ersetzt. Ferner differenzieren sich Fibroblasten, bedingt durch TGF-beta 1, EZM-Proteine und durch erhöhte Gewebespannung, zu Myofibroblasten (Tomasek et al. 2002). Sie produzieren das alpha-smooth-muscle Actin, das in das Zytoskelett der Zellen integriert wird, und üben so Zugkräfte auf die umgebende Extrazellulärmatrix aus (Hinz et al. 2001a). In der regenerativen Phase, die sich über mehrere Monate erstrecken kann, wird das kontrahierte Granulationsgewebe sukzessiv durch Narbengewebe ersetzt. Die an der Regeneration des Gewebes beteiligten Zellen sterben anschließend den „programmierten Zelltod“ und die Aktivität der Wundheilungsprozesse sinkt. Matrix-Metallo-Proteinasen wandeln Kollagen vom Typ 3 in den Typ 1 um. Das Gewebe wird gestärkt, erhält aber nie die Eigenschaften (z.B. die Zugspannung) unverletzter Haut (Levenson et al. 1965, Lovvorn et al. 1999).

2.3 Rolle der Myofibroblasten hinsichtlich der sekundären Wundheilung

Die Ursache von Wundheilungsstörungen ist häufig auf molekularer Ebene zu suchen. Eine Schlüsselrolle scheint dabei der Myofibroblast zu spielen (Desmouliere et al. 2005, Gabbiani 2003). In pathologischen Wundheilungsprozessen persistiert die Aktivität dieser kontraktile Zellen und die Folge sind dann fibrotische Veränderungen in Organen. Prinzipiell reagieren Myofibroblasten auf physikalische Faktoren und auf Zytokine, die den Aktivitätslevel bestimmen und folglich auf den Heilungsverlauf wirken. Abbildung 1-1 gibt einen Überblick über die Größen, die Einfluss auf die Aktivität von Myofibroblasten und somit auf die Entstehung von hypertrophen Narben haben.

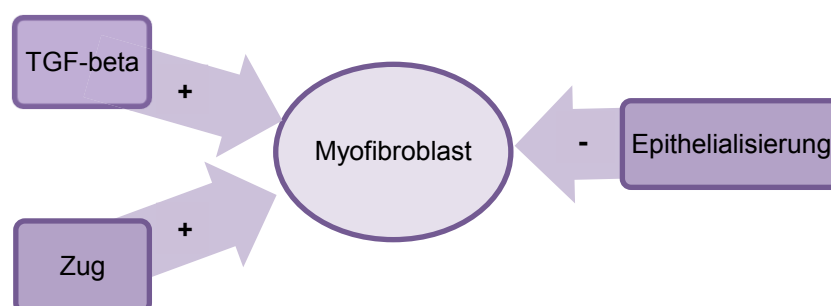


Abb. 1-1: Einflussfaktoren der Myofibroblasten

TGF-beta unterstützt während der Proliferationsphase die Differenzierung vom Fibroblasten zum Myofibroblasten durch Expression des alpha-smooth-muscle Actins und wirkt somit positiv auf die Wundkontraktion (Feng und Derynck 2005, Tomasek et al. 2002). TGF-beta vermittelt seine Signale hauptsächlich über Smad-Proteine. Dabei handelt es sich um intrazelluläre Mediatoren, die als nukleare Transkriptionsaktivatoren agieren (Derynck et al. 1998, Massague 1998). Die sogenannten R-Smad (receptor-activated) 2 und 3 fördern die Expression TGF-beta-responsiver Gene, die I (inhibitory)-Smads 6 und 7 hingegen unterbrechen die Signalkaskade. Ist der Wundbereich vollständig epithelialisiert, sinkt die alpha-SMA-Aktivität und die Myofibroblasten werden apoptotisch (Desmouliere et al. 1995). Induzierender Faktor scheint das Interleukin-1 zu sein, das zeitgerecht von den Wundkeratinozyten sezerniert wird um eine weitere TGF-beta-vermittelte alpha-SMA-Expression zu unterdrücken (Kanangat et al. 2006, Shephard et al. 2004b). Ein dritter Faktor, der auf die Wundkontraktion und folglich auf die Narbenentstehung wirkt, sind die physikalischen Gegebenheiten in der Wunde. Verändert sich nach einer Verletzung die mechanische Umwelt der EZM, erfolgt die Inkorporation von alpha-SMA in die Spannungsfasern der Myofibroblasten und verleiht ihnen so ihre hohe Kontraktilität (Eckes und Krieg 2004, Hinz et al. 2001b, Marenzana et al. 2006). Hält die mechanische Beanspruchung aufgrund der reduzierten Apoptose an sind hypertrophe Narben die Folge (Aarabi et al. 2007).

3 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Die Versorgung chronischer Wunden und hypertropher Narben stellt noch immer ein Problem dar. Sekundär heilende Wunden führen zu einer erheblichen perioperativen Morbidität der Patienten. Ökonomische Aspekte sollten ebenfalls nicht außer Acht gelassen werden. Hauptfaktor der Narbenkontraktion ist der Myofibroblast, der durch TGF-beta und Zug aktiviert und durch vollständige Epithelialisierung apoptotisch wird. Vor diesem Hintergrund war es Ziel der Arbeit das Expressionsprofil der R-Smads 2/3 und des I-Smads 7 über einen Zeitraum von 28 Tagen posttraumatisch zu erfassen und einen Zusammenhang zur Wundkontraktion und Reepithelialisierung herzustellen. Es werden folgende Fragestellungen untersucht:

- I. Welchen Einfluss hat das Ausmaß des chirurgischen Operationstraumas auf die Expression inhibitorischer Transkriptionsfaktoren des TGF-beta Pathway?
- II. Hat das Ausmaß des chirurgischen Traumas eine Auswirkung auf das nukleoplasmatische Shutteling aktivierter Smad2/3 Komplexe?
- III. Werden die heilungsassoziierten Reepithelialisierungsvorgänge durch die Aktivität der TGF-beta Smad -Achse beeinflusst?
- IV. Welcher Zusammenhang besteht zwischen Reepithelialisierung und Wundkontraktion?
- V. Bestehen Verknüpfungen zwischen den Expressionsprofilen der R- und I-Smads?

4 Material

4.1 Versuchstiere

Im Rahmen vorliegender Studie wurden 55 Mäuse des Inzucht-Stammes C57/BL6 Jax (Service Einheit Kleinnager, Uniklinikum Jena) verwendet. Das durchschnittliche Alter der Tiere betrug zu Studienbeginn 8-14 Wochen. Ihr Körpergewicht lag zwischen 16 und 31 g. Die Tiere wurden zur Identifikation mit Ohrlochmarkierung versehen und während des Versuchszeitraumes in Makrolon Typ II-long – Käfigen (bis zu 6 Tiere pro Käfig) in den Räumen der Quarantäne der Service Einheit Kleinnager im Forschungszentrum Lobeda gehalten. Die Umgebungstemperatur lag bei 22 ± 2 °C, die Luftfeuchte betrug 40-60%. Ein Luftaustausch von 12x pro Stunde, sowie ein Hell-Dunkelrhythmus von 14 h hell und 10 h dunkel waren gewährleistet. Die Tiere erhielten eine pelletierte Nagerstandarddiät und mit Salzsäure pH 2,7-3,0 angesäuertes, autoklaviertes Leitungswasser ad libitum. Die Studie wurde auf Grundlage des vom Thüringer Landesamt für Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz genehmigten Tierversuchsantrags (Reg.-Nr. 02-12/05) durchgeführt.

4.2 Geräte

| | |
|--------------|--|
| Feuchtkammer | Magnetic Immuno Staining Tray, (Cell Path, Newtown Großbritannien) |
| Käfige | Makrolon Typ II- long (Techniplast, Varese Italien) |
| Magnetrührer | IKA® RCT basic, (IKA® Werke GmbH & Co. KG, Staufen Deutschland) |
| Mikrotom | Leica RM 2145, (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar Deutschland) |
| Ph-Meter | Argus, (Sentron, Roden Niederlande) |

| | |
|----------------|---|
| Trockenschrank | Heraeus Instruments, (Heraeus Holding GmbH, Hanau Deutschland) |
| Vortexer | Vortex-Genie 2, (Scientific Industries, Inc., Bohemia USA) |
| Waage | Sartorius LE 323S, (Sartorius AG, Göttingen Deutschland) |

4.3 Verbrauchsartikel und Chemikalien

| | |
|-------------------|--|
| CaCl ₂ | (Merck KGaA, Darmstadt Deutschland) |
| Deckgläser | 24x50mm, (Menzel GmbH & Co. KG, Braunschweig Deutschland) |
| Diethylether | (Fischar, Saarbrücken Deutschland) |
| Eosin | (Merck KGaA, Darmstadt Deutschland) |
| Essigsäure | 2%, (Dr. K. Hollborn & Söhne GmbH & Co KG, Leipzig Deutschland) |
| Eukitt | (O. Kindler GmbH & Co., Freiburg Deutschland) |
| Fettstift | Dako Pen, (Dako, Glostrup Dänemark) |
| Formalin | 5%, (Otto Fischar GmbH & Co. KG, Saarbrücken Deutschland) |
| Hämalaun | (Merck KGaA, Darmstadt Deutschland) |
| Isopropanol | 100%, (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe Deutschland) |
| Magermilchpulver | (Heirler Cenovis GmbH, Radolfzell Deutschland) |

| | |
|-------------------------------------|--|
| Mariderm 4-0 | (Catgut, Markneukirchen Deutschland) |
| Methanol | (Mallinckrodt Baker B.V., Deventer Niederlande) |
| NaCl | (Mallinckrodt Baker B.V., Deventer Niederlande) |
| Nagerstandarddiät | V1534-300 Haltungsfutter, (Ssniff, Soest Deutschland) |
| Objektträger | 25x75x1mm SuperFrost, (Menzel GmbH & Co. KG, Braunschweig Deutschland) |
| Paraffin | (Merck KGaA, Darmstadt Deutschland) |
| Pipetten | (Copan, Brescia Italien) |
| Softasept N | (Braun, Melsungen Deutschland) |
| Tris(hydroxymethyl) -aminomethan | (Merck KGaA, Darmstadt Deutschland) |
| Trypsin | Gibco, (Invitrogen GmbH, Karlsruhe Deutschland) |
| Tween 20 | (Dako, Glostrup Dänemark) |
| H ₂ O ₂ | 30%, (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe Deutschland) |
| Xylol | (Merck KGaA, Darmstadt Deutschland) |

4.4 Material Immunhistochemie

| | |
|------------------|--|
| Antibody Diluent | (Dako, Glostrup Dänemark) |
| DAB | (Dako, Glostrup Dänemark) |
| HRP-BioFX | (BioFx Laboratories, Owings Mills USA) |

| | |
|-------------------------------------|---|
| Normalserum | Rabbit-Serum, (Dako, Glostrup Dänemark) |
| Primärantikörper Smad 2/3 (N-19) | goat, polyklonal, Clon: sc-6032, (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz USA) |
| Primärantikörper Smad 7 (N-19) | goat, polyklonal, Clon: sc-7004, (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz USA) |
| Sekundärantikörper | rabbit, anti-goat biotinyliert, (Dako, Glostrup Dänemark) |

4.5 Lösungen

| | |
|----------------|--|
| Blotto | 2,5g Magermilchpulver, 50ml Tris-Lsg., 50µl Tween 20 |
| Tris- Puffer | 100ml Stamm- Lösung, 900ml Aqua dest., 0,2-0,5 ml Tween 20 |
| Stamm-Lösung | 60,5g Tris(hydroxymethyl) -aminomethan in 700ml Aqua dest. lösen, Lösung bis 1000ml mit Aqua dest. auffüllen, 90g NaCl darin lösen, Ph-Wert auf 7,6 einstellen |
| Trypsin (0,1%) | 100mg CaCl_2 in 100ml Tris-Puffer lösen und Ph-Wert auf 7,8 einstellen, 10 Minuten vor Gebrauch 100mg Trypsin lösen und aktiv bei 37°C den Ph-Wert kontrollieren |

5 Methode

5.1 Gewinnung der Proben

Die Narkose der Tiere erfolgte mittels Ether-Dampf. Die Augen der Tiere wurden zum Schutz vor Austrocknung mit NaCl-getränkten Gazetupfern zugebunden. Im Anschluss erfolgte die Fixation der Tiere in Rückenlage mittels Heftpflaster auf einem Plexiglas-Op-Brett. Vor der Probenentnahme wurde die Leistenregion bilateral enthaart und mit Softasept N desinfizierend abgerieben. Es wurden 2 Exzisionswunden definierter Größe in der Leistenregion gesetzt. Die dabei anfallende Haut wurde zur Etablierung eines Kontrollstandards asserviert. Eine der Wunden wurde der freien Granulation überlassen (sekundäre Wunde), während die Andere mit drei Einzelknopfnähten verschlossen wurde (primäre Wunde), Abb. 5-1.

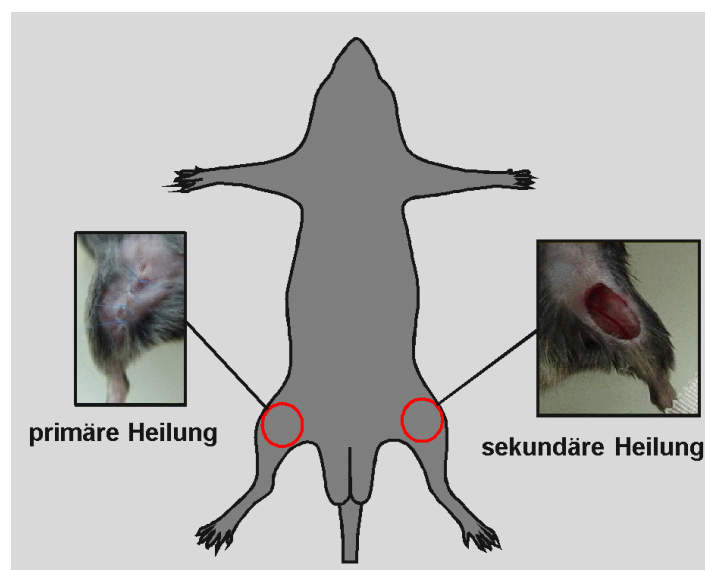


Abb. 5-1: Lokalisation der Probenentnahme

Nach 3, 7, 14, 22 und 28 Tagen wurden die Tiere durch Hyperinsufflation mit Etherdampf getötet und es wurden Proben aus den Wundgebieten entnommen. Die Eingriffe erfolgten bilateral.

5.2 Fixierung und Einbettung

Die gewonnenen Biopsate wurden in 5%ig gepufferten Formalin fixiert, um die Zerstörung der Proteine (Antigene) durch Autolyse oder Fäulnis zu verhindern. Die Proben wurden dauergewässert, in 70%igen Alkohol gestellt und anschließend über die aufsteigende Alkoholreihe dehydriert. Im letzten Schritt werden die Proben über das Zwischenmedium Xylol in Paraffin eingebettet.

5.3 Herstellung von Schnittpräparaten

Aus den tiefgefrorenen Paraffinblöcken wurden, mit Hilfe des Mikrotoms, Schnitte von 4µm Schichtdicke gewonnen. Diese Schnitte wurden zunächst in ein Kaltwasserbad (22°C) überführt und auf beschichtete Objektträger gezogen. Anschließend gelangten die Objektträger in ein Wärmestreckbad (50°C) um die Schnitte zu glätten. Im Weiteren trockneten die Schnittpräparate über Nacht im Wärmeschränk bei 37°C, um unter dem Schnitten verbliebenes Wasser vollständig zur Abtrocknung zu bringen. Bei der Herstellung der Schnittpräparate wurde darauf geachtet, dass die Gewebeschnitte eine gute Qualität besitzen. Die Herstellung von zu dicken Schnitten würde das immunhistochemische Färbeergebnis beeinträchtigen.

5.4 Hämatoxylin- Eosin- Färbung

Von allen Präparaten wurde eine HE-Färbung angefertigt, um diese histomorphometrisch auszuwerten. Zunächst wurden die Schnitte mittels Xylol (1x 10 Minuten in Xylol 2 und 1x 10 Minuten in Xylol 1) entparaffiniert und anschließend über die absteigende Alkoholreihe (2x 1 Minute 100% Isopropanol, 1 Minute 96% Isopropanol, 1 Minute 80% Isopropanol, 1 Minute 60% Isopropanol, 1 Minute 50% Isopropanol) rehydriert. Danach wurden die Schnitte in Aqua dest. gespült. Anschließend wurden die Schnitte 20 Minuten mit Hämalaun nach Mayer gefärbt und 7 Minuten im Leitungswasser gebläut. Im Ergebnis erhält man blau eingefärbte Zellkerne. Nach kurzem Spülen in Aqua dest. wurde die

Zytoplasmafärbung 5-10 Minuten in Eosin durchgeführt. Nach nochmaligem kurzen Spülen in Aqua dest. erfolgten die Dehydrierung der Schnitte mittels aufsteigender Alkoholreihe und anschließend das Eindecken mit Eukitt.

5.5 Immunhistochemie

Der Nachweis der Proteine Smad2/3 und Smad7 erfolgte über die indirekte Immunhistochemie mit der ABC (Avidin-Biotin-Komplex)-Methode. Bei diesem Vorgehen verwendet man 3 entscheidende Reagenzien: einen Primärantikörper, einen Sekundärantikörper (Brückenantikörper) und den Strept-Avidin-Biotin-Komplex, Abb. 5-2.

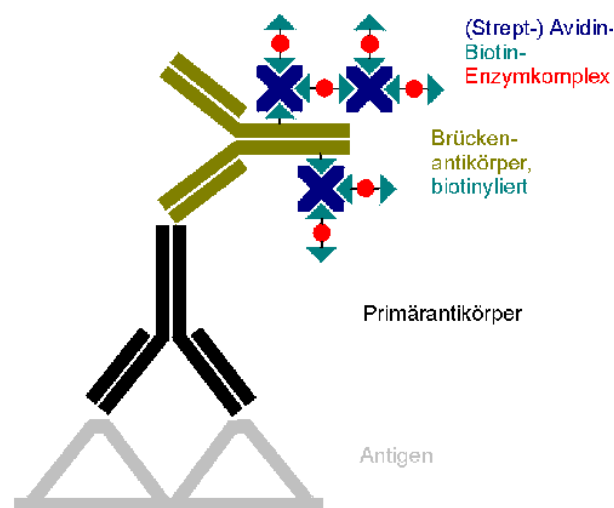


Abb. 5-2: Schematische Darstellung der ABC-Methode

Der erste Antikörper ist spezifisch für das Antigen und lokalisiert es. Der zweite Antikörper bindet an den Ersten und ist mit Biotin markiert d.h. biotinyliert. An den Brückenantikörper bindet das dritte Reagenz, der Avidin-Biotin-Komplex, indem man sich die Affinität von Avidin und Biotin zunutze macht. An den Komplex ist ein Enzym gekoppelt, die Peroxidase. Das Chromogen Diaminobenzidin (DAB) ist in der Lage die Peroxidase und somit auch das Antigen sichtbar zu machen. Im Folgenden sollen die einzelnen Schritte kurz dargestellt werden.

Zu Beginn wurden die Paraffinschnitte mittels Xylol (1x 10 Minuten in Xylol 2 und 1x 10 Minuten in Xylol 1) entparaffiniert und durch die absteigende Alkoholreihe (2x 1 Minute 100% Isopropanol, 1 Minute 96% Isopropanol, 1 Minute 80% Isopropanol, 1 Minute 60% Isopropanol, 1 Minute 50% Isopropanol) rehydriert.

Anschließend erfolgte das 3malige Spülen im Waschpuffer für jeweils 5 Minuten. Es wurde ein Tris-Puffer mit einem Ph-Wert von 7,6 verwendet, dessen Stringenz (erhöhte Waschkraft) mit Hilfe von Tween 20 gesteigert wurde. Diese Pufferlösung wird in der Immunhistochemie zwischen den einzelnen Arbeitsschritten genutzt, um ungebundene oder unspezifisch gebundene Antikörper vom Schnitt herunter zu spülen. Auf diese Weise gewährleistet man eine spezifische Antikörperbindung. Je sauberer ein Puffer wäscht, desto weniger unspezifische Hintergrundfärbungen werden das spätere Endergebnis der Färbung beeinträchtigen.

Der Farbstoff DAB kann nicht zwischen Biotin-Avidin gekoppelter und endogener d.h. im Gewebe vorhandener Peroxidase unterscheiden. Aus diesem Grund wurde im nächsten Schritt die endogene Peroxidase inhibiert, um falsch-positive Ergebnisse zu vermeiden. Zunächst inkubiert man die Schnitte für 20 Minuten in einer Wasserstoffperoxid-haltigen Lösung (90ml Methanol, 140ml Wasser und 1,2ml 30%igen H_2O_2) und wäscht sie danach 3malig in Tris.

Sowohl durch Formalinfixierung provozierte Aldehydvernetzungen als auch durch Strukturveränderungen, kann sich das Antigen soweit verändern, dass es nicht mehr vom Antikörper erkannt wird. Aus diesem Grund erfolgte die enzymatische Demaskierung mit Trypsin (0,1%) bei 37°C im Wasserbad für 8 Minuten um die für den Primärantikörper spezifischen Epitope im Gewebe freizulegen. Im Anschluss wurden die Schnitte für jeweils 5 Minuten in Leitungswasser, Aqua dest. und 3mal in Tris gespült um eine anhaltende Enzymwirkung zu unterbinden.

Ein weiterer Schritt um unspezifische Färbungen zu verhindern, ist das Blockieren mit dem Normalserum (Rabbit-Serum). Man verwendet ein Serum, das der gleichen Tierspezies entstammt wie der Sekundärantikörper und nicht mit den nachzuweisenden Antigenen immunisiert wurde. Die Wirkung beruht auf einer Absättigung von elektrostatischen Ladungen der Proteine im Biopsat, sodass der

nachfolgende Primärantikörper nur noch spezifische Bindungen eingeht. Nach Umranden der Präparate mit einem Fettstift, wurde eine Mischung aus Blotto und Normalserum (5µl Serum auf 1ml Blotto) aufgetragen. Das Magermilchpulver besitzt ebenfalls die positive Eigenschaft Hintergrundreaktionen zu minimieren. Die Schnitte wurden 30 Minuten in Feuchtkammern bei Raumtemperatur inkubiert. Man verwendet Feuchtkammern um die Verdunstung der aufgetragenen Lösungen zu reduzieren.

Nach Abkippen des Normalserums wird der, mit Antibody Diluent verdünnte, Primärantikörper (Goat, polyklonal, Verdünnung 1:40) aufgetragen und über Nacht bei 4°C in den Feuchtkammern inkubiert. Parallel wurde auf den Schnitten eine Kontrolle mitgeführt. Sie wurde nicht mit dem Primärantikörper inkubiert, sondern lediglich mit Antibody Diluent. Die Kontrollprobe dient als Nachweis der spezifischen Antikörperbindungen und sollte daher nach Auftragen des Chromogens keine DAB-Färbung aufweisen. Tritt wider Erwarten ein Farbumschlag auf kann es in erster Linie daran liegen, dass die endogene Peroxidase nicht ausreichend eliminiert wurde oder dass die Antikörper unspezifische Proteinbindungen eingegangen sind. Im Anschluss wurden die Schnitte für 3x 5 Minuten in Tris gespült.

Im nächsten Schritt erfolgte die Inkubation mit dem in Tris verdünnten Sekundärantikörper (Rabbit, Anti-Goat, Verdünnung 1:100). Diese Inkubation erfolgte ebenfalls für 30 Minuten in Feuchtkammern bei Zimmertemperatur. Um ungebundene Antikörper vom Schnitt zu waschen, wurden die Schnitte wieder für 3x 5 Minuten in Tris gespült.

Damit sich ausreichend Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplexe bilden, wird die HRP BioFX (auf 1ml Tris 1µl HRP) 30 Minuten vor Gebrauch angesetzt. Das Untersuchungsmaterial wird dann 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach 3 weiteren Waschschritten in Tris erfolgt die Detektion mit dem Farbstoff Diaminobenzidin (DAB). Die Peroxidase bildet mit seinem Substrat Wasserstoffperoxid einen Komplex, wobei DAB als Elektronendonator fungiert. Nach ungefähr

5 Minuten wurde die gewünschte Farbtintensität erreicht und das Chromogen mit Aqua dest. von den Schnitten gespült.

Abschließend erfolgten die Gegenfärbung mit Hämalaun nach Mayer, die Entwässerung der Schnitte mittels aufsteigender Alkoholreihe und das Eindecken der Präparate mit Eukitt.

5.6 Auswertung der Färbungen

5.6.1 HE-Färbung

Die histomorphometrische Auswertung der HE-gefärbten Schnitte erfolgte bei 50facher Vergrößerung mit Hilfe eines Zeiss- Mikroskops. Es wurden zunächst die Wundbreiten mit Hilfe eines Längen-Tools vermessen und anschließend die epithelialisierten Bereiche ins Verhältnis zur Gesamtwundgröße gesetzt um quantitativ den Epithelialisierungsgrad zu ermitteln, Abb. 5-3. Die Wundgröße wird in μm und der Epithelialisierungsgrad prozentual angegeben. Die Detektion des Wundbereiches erfolgte nach folgenden Aspekten: fehlende Hautanhangsgebilde, geringe/keine Epithelschichtdicke und erhöhte Anzahl an Entzündungszellen. Die qualitative Auswertung erfolgte anhand von Mikrophotographien, die mit Hilfe eines Zeiss Axiovision Mikroskops mit Photoeinrichtung erstellt wurden.

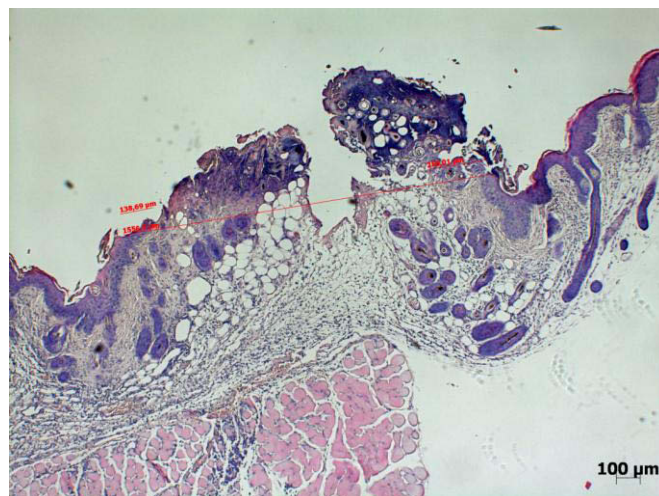


Abb. 5-3: Histomorphometrische Auswertung des Wundbereiches

5.6.2 Immunhistochemie

Die Quantifizierung der histologischen Schnitte erfolgte unter 400facher Vergrößerung. Pro Präparat wurden 3 Gesichtsfelder ausgewählt, in denen sowohl die Gesamtzellzahl der Fibroblasten als auch die Smad2/3- bzw. Smad7-positiv gefärbten Zellen ermittelt wurden, Abb. 5-4. Die eruierten Ergebnisse werden anhand des Labeling-Indexes ausgewertet, d.h. die positiv gefärbten Zellen werden ins Verhältnis zur Gesamtzellzahl gesetzt.

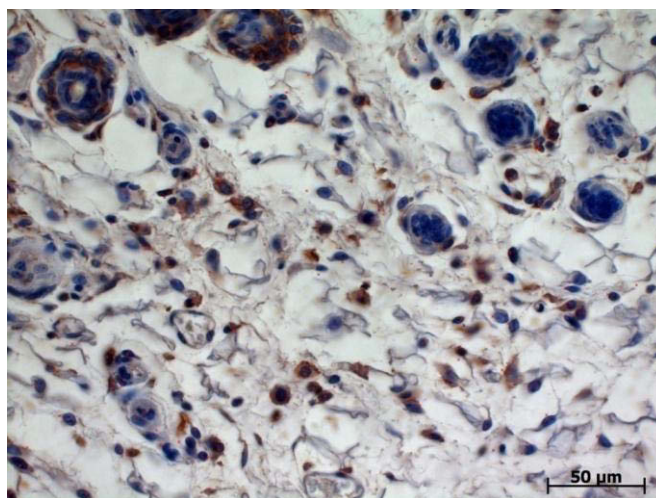


Abb. 5-4: Quantitative Auswertung der positiv gefärbten Zellen

5.6.3 Statistische Auswertung

Bei den HE-gefärbten Schnitten wurden der Epithelialisierungsgrad und die Wundgröße abhängig vom Entnahmezeitpunkt der Probe im primären und sekundären Wundheilungsmodell statistisch ausgewertet. Zusätzlich wurden die ermittelten Labeling-Indexe für die Proteine Smad2/3 und Smad7 für die primäre und sekundäre Wundheilung statistisch evaluiert, um aus diesen Daten ein Genexpressionsprofil abzuleiten. Die Zielgrößen wurden als Median erhoben und graphisch in Boxplot-Diagrammen dargestellt. Zur Beurteilung der Signifikanz wurden die Diskussionsgrößen nicht-parametrisch durch den Mann-Whitney-U-Test berechnet, wobei $p \leq 0,05$ als Signifikanzniveau gewählt wurde. Dieser Wert zeigt an, mit welcher Wahrscheinlichkeit man beim Ablehnen der Nullhypothese einen Irrtum begehen würde. Bei der Überprüfung der Zusammenhänge zwischen

den einzelnen Parametern wurde eine bivariate Korrelation nach Pearson durchgeführt, weil symmetrisch quantitative Variablen vorlagen. Pro Variablenpaar wurden im Ausgabefenster 3 Variablen angezeigt: der Korrelationskoeffizient, der Umfang der Stichprobe sowie die Irrtumswahrscheinlichkeit. Variablenzusammenhänge wurden zur Illustration im Streudiagramm dargestellt.

6 Ergebnisse

6.1 Untersuchten Parameter

6.1.1 Wundbreite und Epithelialisierungsgrad

6.1.1.1 Qualitative Auswertung

An Tag 3 zeigte sich bei der primären Wundheilung eine geringe Wundbreite, wenig Granulationsgewebe und die Ränder weisen eine dünne Epithelialisierung auf, Abb. 6-1. Beim sekundären Wundheilungsmodus hingegen war der Wundbereich ausgedehnter, man sah deutlich Entzündungszellen und von den Rändern des traumatisierten Bereiches ging keine Bildung neuen Epithels aus, Abb. 6-2.

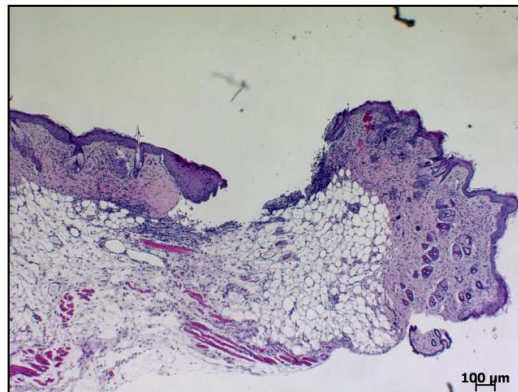
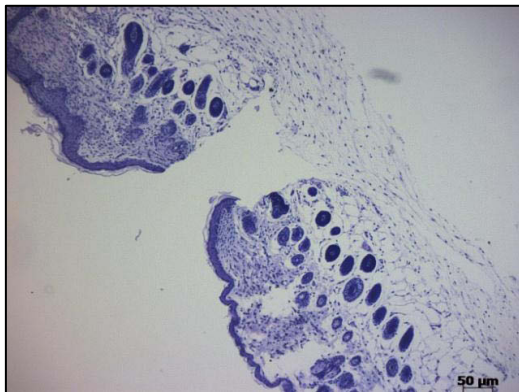


Abb. 6-1: Primärer Wundbereich (Tag 3) Abb. 6-2: Sekundärer Wundbereich (Tag 3)

An Tag 7 wies die primäre Wundheilung im Vergleich zum sekundären Heilungsverlauf eine geringere Wundgröße und eine reduzierte Bildung von Granulationsgewebe auf, Abb. 6-3. Auch im Vergleich zu den Proben die an Tag 3 entnommen wurden, zeigte sich die Wundbreite in beiden Modellen deutlich verkleinert und war von einer dünnen Epithelschicht bedeckt. Der Wundbereich der sekundären Heilung w gekennzeichnet durch Entzündungszellen, Abb. 6-4.

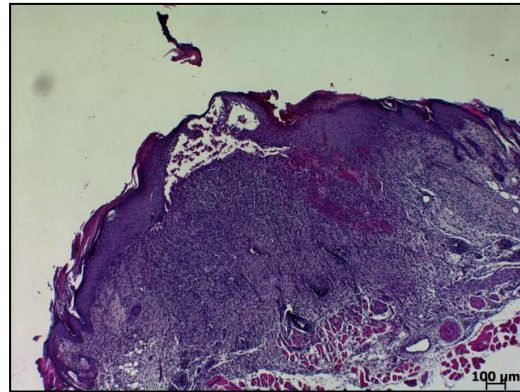


Abb. 6-3: Primärer Wundbereich (Tag 7)

Abb. 6-4: Sekundärer Wundbereich (Tag 7)

An Tag 14 war der Wundbereich der primären Heilung im Vergleich zu Tag 3 und 7 verringert, die Epithelschichtdicke zeigte eine Zunahme. Man sah weder Entzündungszellen noch Granulationsgewebe, Abb. 6-5. Im sekundären Heilungsmodell zeigte sich ebenfalls eine geschlossene Epitheldecke allerdings von geringerer Schichtdicke als bei der primären Wundheilung. Im Vergleich zu den vorherigen Proben an Tag 3 und 7 war im Wundbereich wenig Granulationsgewebe vorhanden und man sah keine Entzündungszellen, Abb. 6-6. In den traumatisierten Bereichen beider Modelle fehlen Hautanhangsgebilde.

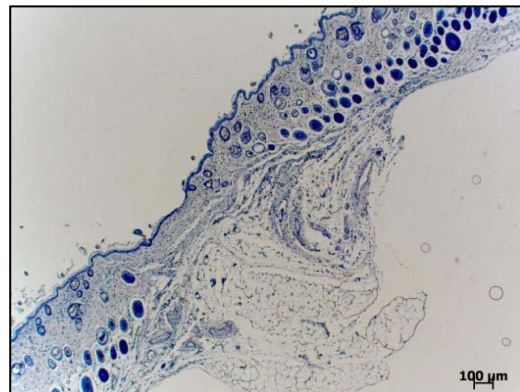
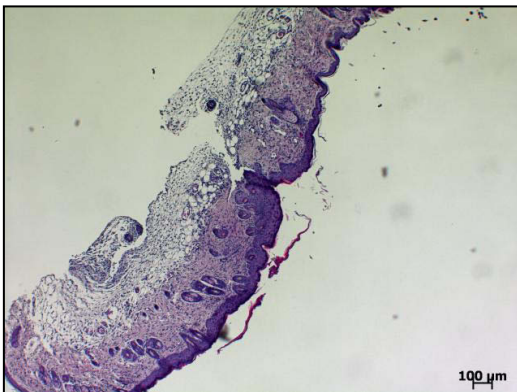


Abb. 6-5: Primärer Wundbereich (Tag 14)

Abb. 6-6: Sekundärer Wundbereich (Tag 14)

An Tag 22 zeigten die Wundbereiche beider Modelle eine Epitheldicke, die der Schichtdicke unversehrter Haut im Nachbarbereich entsprach, Abb. 6-7 und Abb.

6-8. Im sekundären Heilungsverlauf waren noch immer Reste des Granulationsgewebes erkennbar. Sowohl bei der primären als auch bei der sekundären Wundheilung fehlten weiterhin Hautanhangsgebilde.

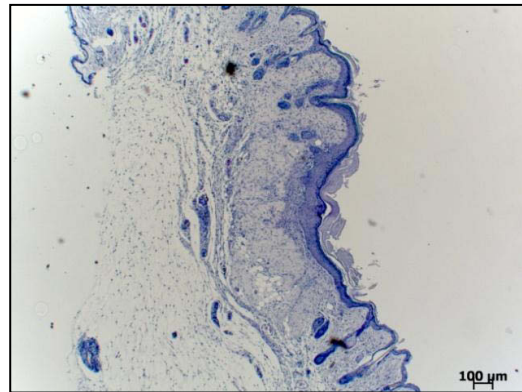
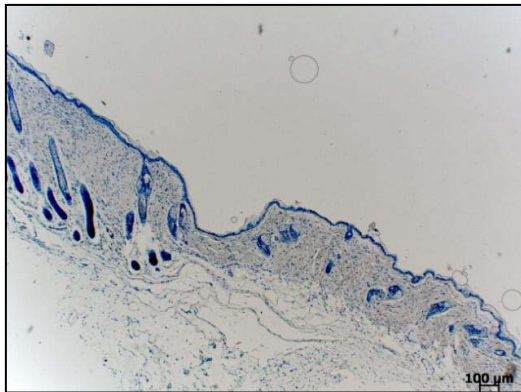


Abb. 6-7: Primärer Wundbereich (Tag 22) Abb. 6-8: Sekundärer Wundbereich (Tag 22)

An Tag 28 war der Wundbereich in beiden Modellen kaum erkennbar, Abb. 6-9 und Abb. 6-10. Es zeigte sich eine geschlossene Epitheldecke und Reorganisation des subepithelialen Bindegewebes, die Neubildung von Hautanhangsgebilden blieb aus.

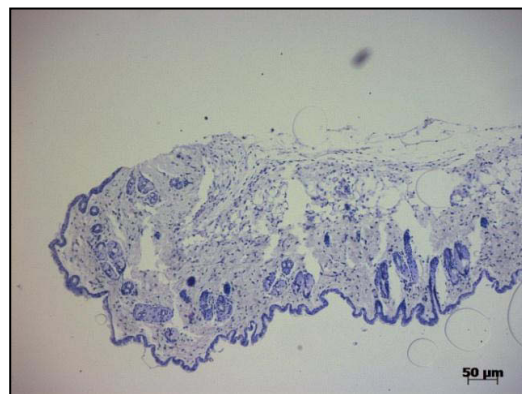


Abb. 6-9: Primärer Wundbereich (Tag 28) Abb. 6-10: Sekundärer Wundbereich (Tag 28)

6.1.1.2 Quantitative Auswertung

Wundbreite

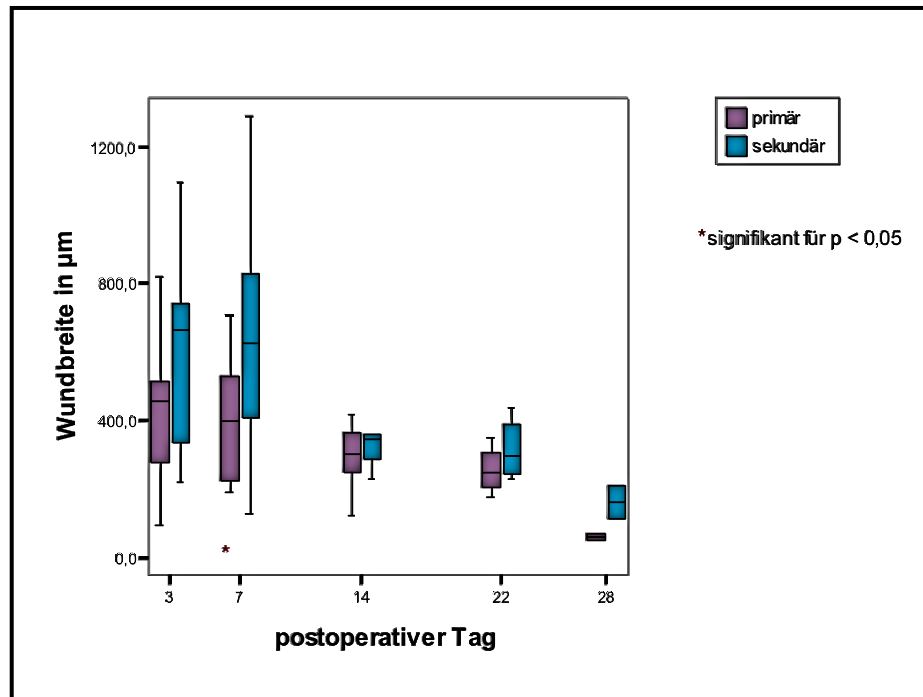


Abb. 6-11: Wundbreiten des primären und sekundären Modelles

In der Abbildung 6-11 sieht man die Wundbreiten des primären und sekundären Modelles vom 3. bis 28. postoperativen Tag. Deutlich wird, dass die Wundbreite bei beiden Heilungsmodellen mit jedem späteren Zeitpunkt der Probenentnahme sinkt und am letzten Tag der Biopsatgewinnung gegen 0 µm tendiert. Weiterhin erkennt man, dass die Mediane der primären Wundheilung an jedem Tag der Probenentnahme unter denen des sekundären Modelles liegen. An Tag 7 beträgt der Signifikanzwert $p = 0,039$ und liegt damit unter dem 0,05-Niveau d.h. die Mediane des primären und sekundären Modelles unterscheiden sich an dem Tag signifikant voneinander. In der Tabelle 6-1 sind die Ergebnisse im Einzelnen aufgeführt.

Tab. 6-1: Wundbreiten des primären und sekundären Modells und deren Signifikanzen

| | Median Wundbreite primäre WH | Median Wundbreite sekundäre WH | Signifikanz |
|--------|---------------------------------|-----------------------------------|-------------|
| Tag 3 | 456,32 | 665,64 | 0,222 |
| Tag 7 | 397,74 | 628,52 | 0,039 * |
| Tag 14 | 303,73 | 345,65 | 0,699 |
| Tag 22 | 251,22 | 298,90 | 0,686 |
| Tag 28 | 62,50 | 164,67 | 0,333 |

* signifikant für $p \leq 0,05$

Epithelialisierung

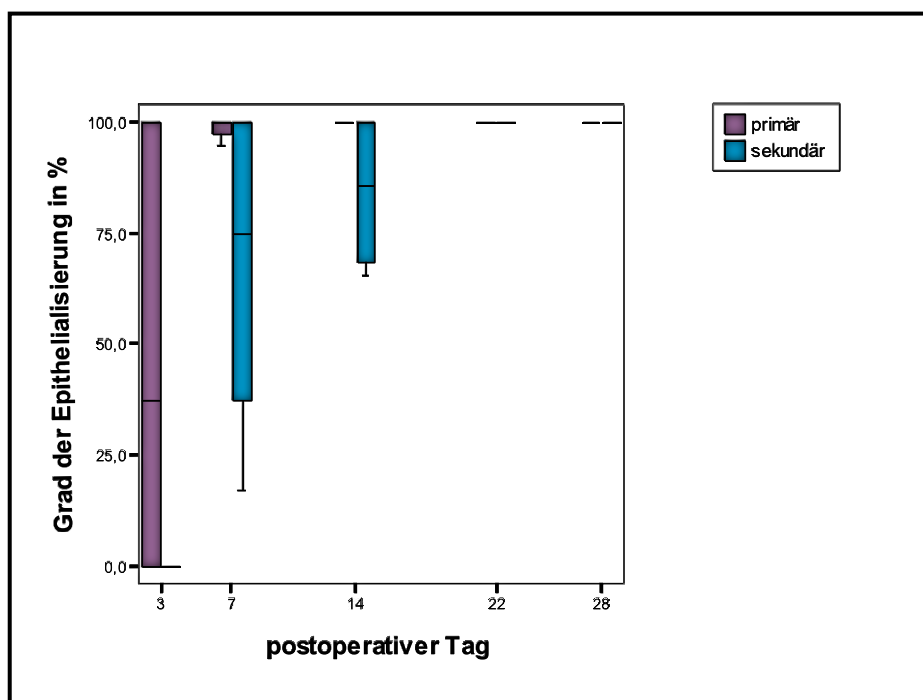


Abb. 6-12: Reepithelialisierung des primären und sekundären Modelles

Die Abbildung 6-12 zeigt den Grad der Epithelialisierung der primären und sekundären Wundheilung für die 28 Tage postoperativ. Für beide Wundheilungsmodelle gilt, dass mit jedem späteren Zeitpunkt der Probenentnahme die Epithelbildung zunimmt. Deutlich wird allerdings, dass beim primären

Heilungsverlauf die Wunde bereits am 7. Tag eine vollständige Epitheldecke aufwies, beim sekundären Modell erst am 22. Tag. In Tabelle 6-2 sind die einzelnen Werte im Detail aufgeführt. Signifikante Zusammenhänge konnten nicht nachgewiesen werden.

Tab. 6-2: Epithelbildung des primären und sekundären Modelles und deren Signifikanzen

| | Median Epithel primäre WH | Median Epithel sekundäre WH | Signifikanz |
|--------|------------------------------|--------------------------------|-------------|
| Tag 3 | 37,30 | 0,00 | 0,113 |
| Tag 7 | 100,00 | 74,95 | 0,128 |
| Tag 14 | 100,00 | 85,55 | 0,485 |
| Tag 22 | 100,00 | 100,00 | 1 |
| Tag 28 | 100,00 | 100,00 | 1 |

6.1.2 Smad 2/3

6.1.2.1 Qualitative Auswertung

Tag 3

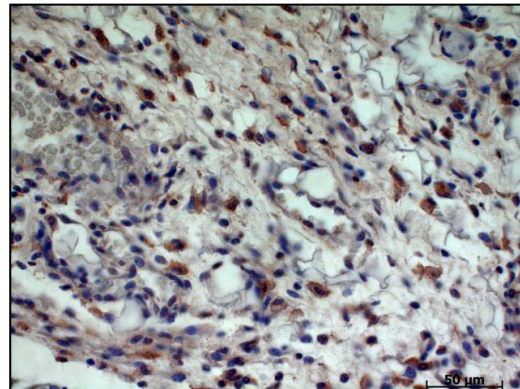
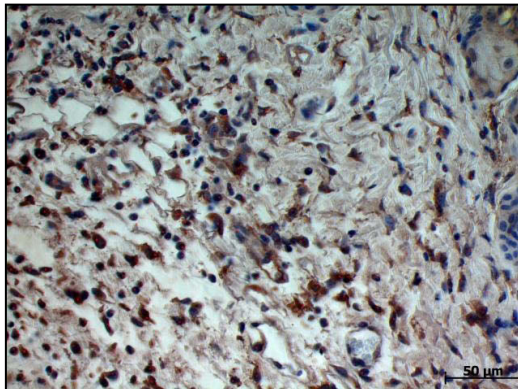


Abb. 6-13: Primäre WH (Smad2/3 gefärbt) Abb. 6-14: Sekundäre WH (Smad2/3 gefärbt)

Tag 7

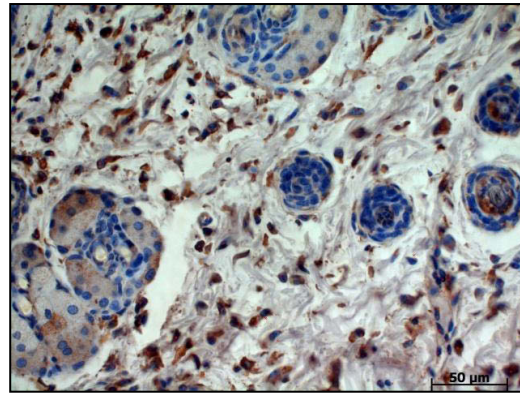
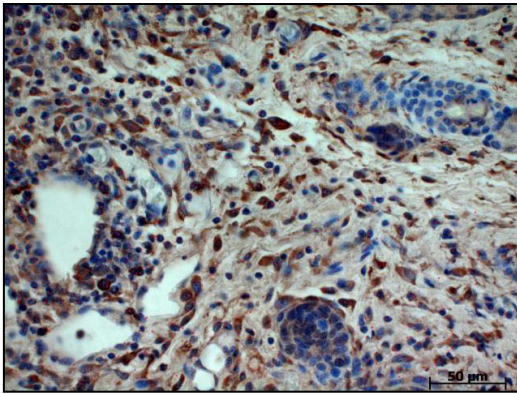


Abb. 6-15: Primäre WH (Smad2/3 gefärbt) Abb. 6-16: Sekundäre WH (Smad2/3 gefärbt)

Tag 14

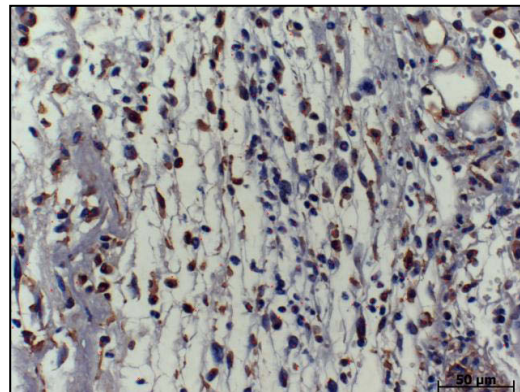
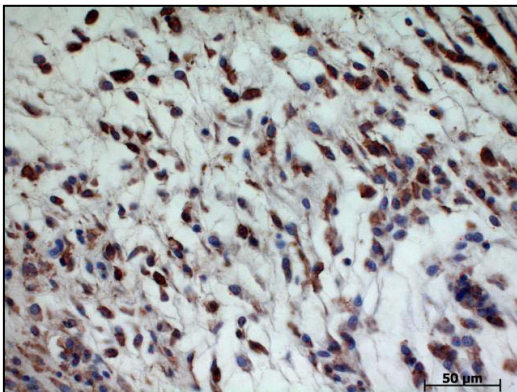


Abb. 6-17: Primäre WH (Smad2/3 gefärbt) Abb. 6-18: Sekundäre WH (Smad2/3 gefärbt)

Tag 22

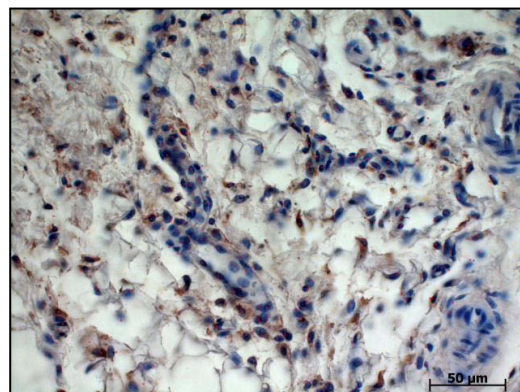
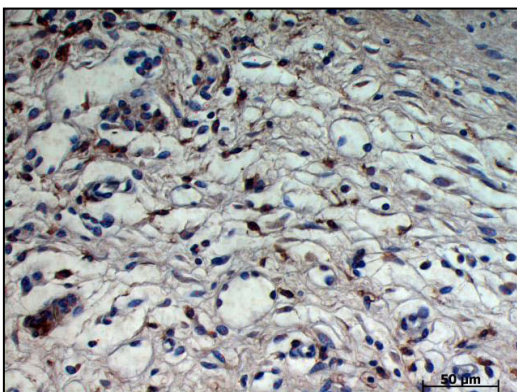


Abb. 6-19: Primäre WH (Smad2/3 gefärbt) Abb. 6-20: Sekundäre WH (Smad2/3 gefärbt)

Tag 28

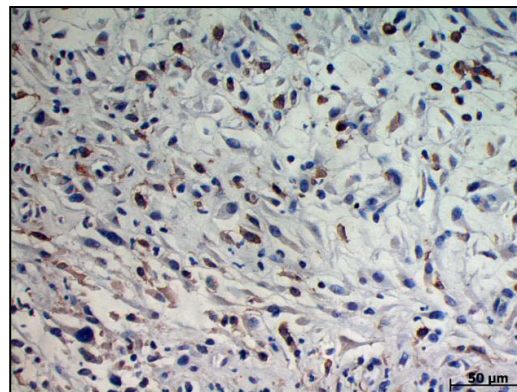
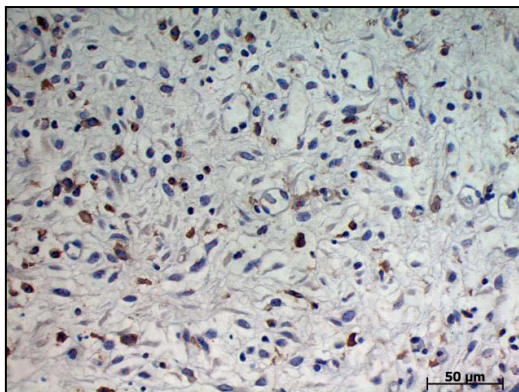


Abb. 6-21: Primäre WH (Smad2/3 gefärbt) Abb. 6-22: Sekundäre WH (Smad2/3 gefärbt)

Mit jedem späteren Zeitpunkt der Probenentnahme wird sowohl für die primäre als auch für die sekundäre Wundheilung deutlich, dass sich der Anteil an Smad2/3-positiv gefärbten Zellen verringerte, Abb. 6-13 bis Abb. 6-22. Deutliche Unterschiede zwischen dem primären und sekundären Modell konnten anhand der Mikrophotographien nicht ermittelt werden.

6.1.2.2 Quantitative Auswertung

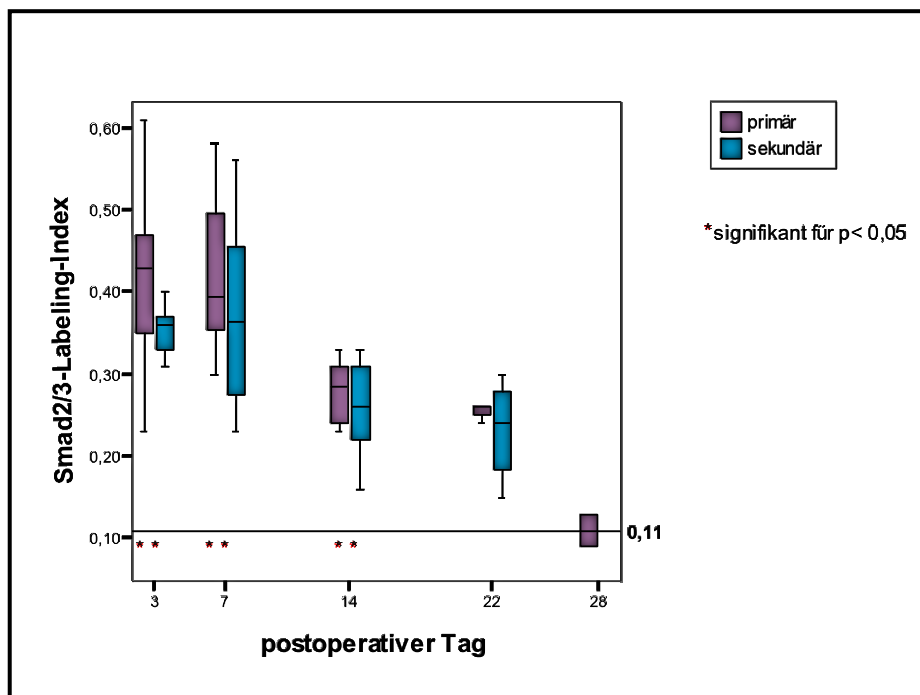


Abb. 6-23: Smad2/3-Expressionsprofil des primären und sekundären Modelles

Die Abbildung 6-23 zeigt das Smad2/3-Expressionsprofil für den primären und sekundären Heilungsverlauf zwischen dem 3. und 28. postoperativen Tag. Weiterhin ist der Median der Kontrollen, der bei 0,11 liegt, als Referenzlinie eingezeichnet. In beiden Modellen sank der Labeling-Index über den Zeitraum der Regeneration, bis am 28. postoperativen Tag der Wert der Kontrollhäute erreicht wurde. Am 3., 7. und 14. Tag lag der Signifikanzwert unter dem 0,05-Niveau, d.h. es bestand sowohl zwischen den Medianen der primären Wundheilung/Kontrolle als auch zwischen den Medianen der sekundären Wundheilung/Kontrolle ein signifikanter Zusammenhang. Die einzelnen Ergebnisse sind in Tabelle 6-3 und Tabelle 6-4 aufgeführt.

Tab. 6-3: Smad2/3-Labeling-Index für die primäre und sekundäre Wundheilung

| | Median Smad2/3 primäre WH | Median Smad2/3 sekundäre WH |
|--------|------------------------------|--------------------------------|
| Tag 3 | 0,43 | 0,36 |
| Tag 7 | 0,40 | 0,37 |
| Tag 14 | 0,29 | 0,26 |
| Tag 22 | 0,26 | 0,24 |
| Tag 28 | 0,11 | 0,11 |

Tab. 6-4: Signifikanzen des primären und sekundären WH-Modell und der Kontrollhäute

| | Signifikanz primär-sekundär | Signifikanz primär-Kontrolle | Signifikanz sekundär-Kontrolle |
|--------|--------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|
| Tag 3 | 0,161 | 0,000 * | 0,000 * |
| Tag 7 | 0,242 | 0,000 * | 0,000 * |
| Tag 14 | 0,589 | 0,000 * | 0,010 * |
| Tag 22 | 0,686 | 0,057 | 0,114 |
| Tag 28 | 1 | - | - |

* signifikant für $p \leq 0,05$

6.1.3 Smad 7

6.1.3.1 Qualitative Auswertung

Tag 3

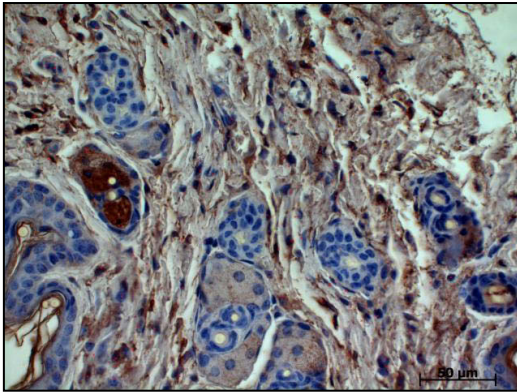


Abb. 6-24: Primäre WH (Smad7 gefärbt)

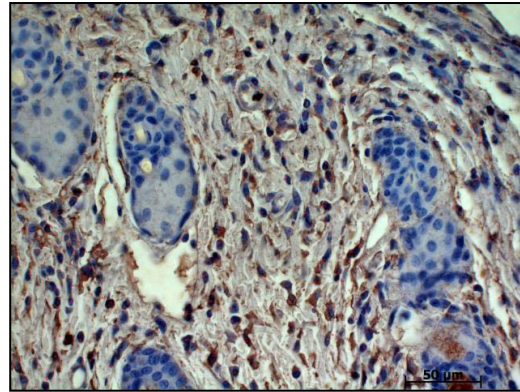


Abb. 6-25: Sekundäre WH (Smad7 gefärbt)

Tag 7

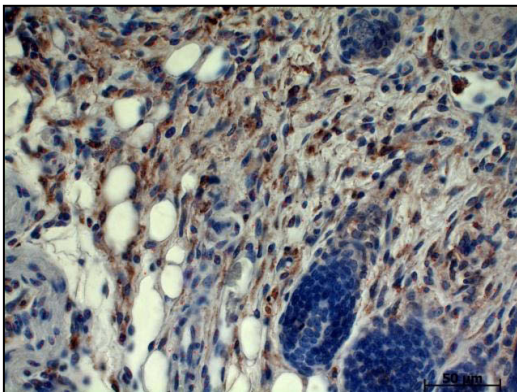


Abb. 6-26: Primäre WH (Smad7 gefärbt)

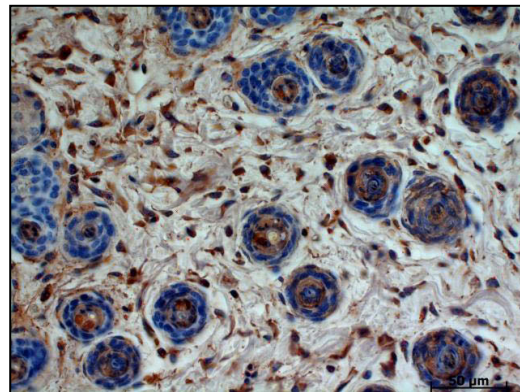


Abb. 6-27: Sekundäre WH (Smad7 gefärbt)

Tag 14

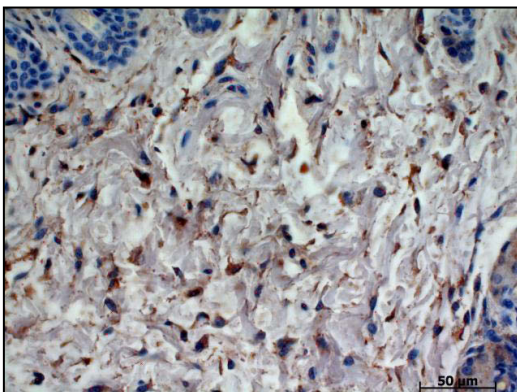


Abb. 6-28: Primäre WH (Smad7 gefärbt)

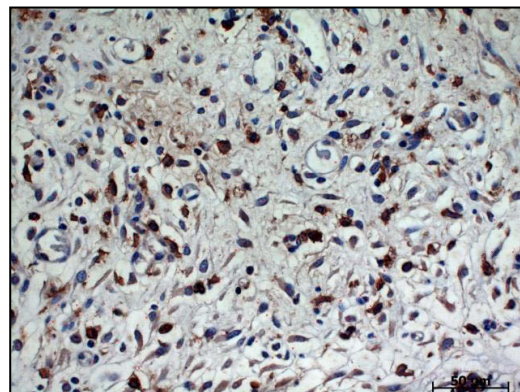


Abb. 6-29: Sekundäre WH (Smad7 gefärbt)

Tag 22

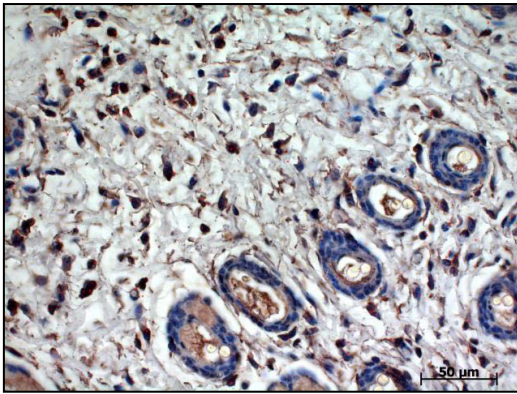


Abb. 6-30: Primäre WH (Smad7 gefärbt)

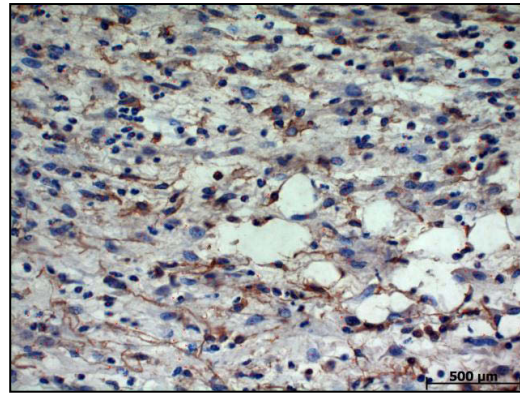


Abb. 6-31: Sekundäre WH (Smad7 gefärbt)

Tag 28

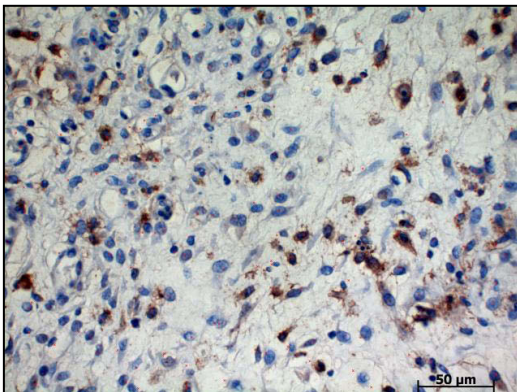


Abb. 6-32: Primäre WH (Smad7 gefärbt)

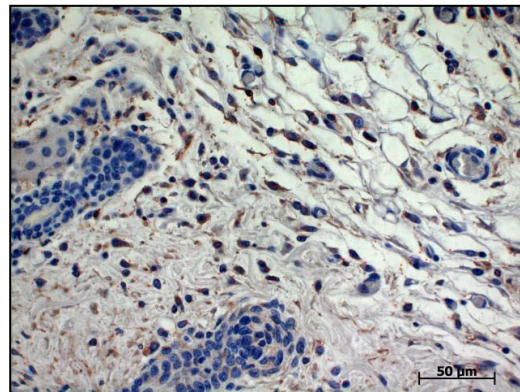


Abb. 6-33: Sekundäre WH (Smad7 gefärbt)

Tendenziell lässt sich zusammenfassen, dass der Anteil Smad7-positiv gefärbter Zellen über den postoperativen Zeitraum von 28 Tagen abnahm, d.h. der Labeling-Index wurde kleiner, Abb. 6-24 bis Abb. 6-33. Konkrete Unterschiede sind anhand der Mikrophotographien nicht erkennbar, können aber der quantitativen Auswertung entnommen werden.

6.1.3.2 Quantitative Auswertung

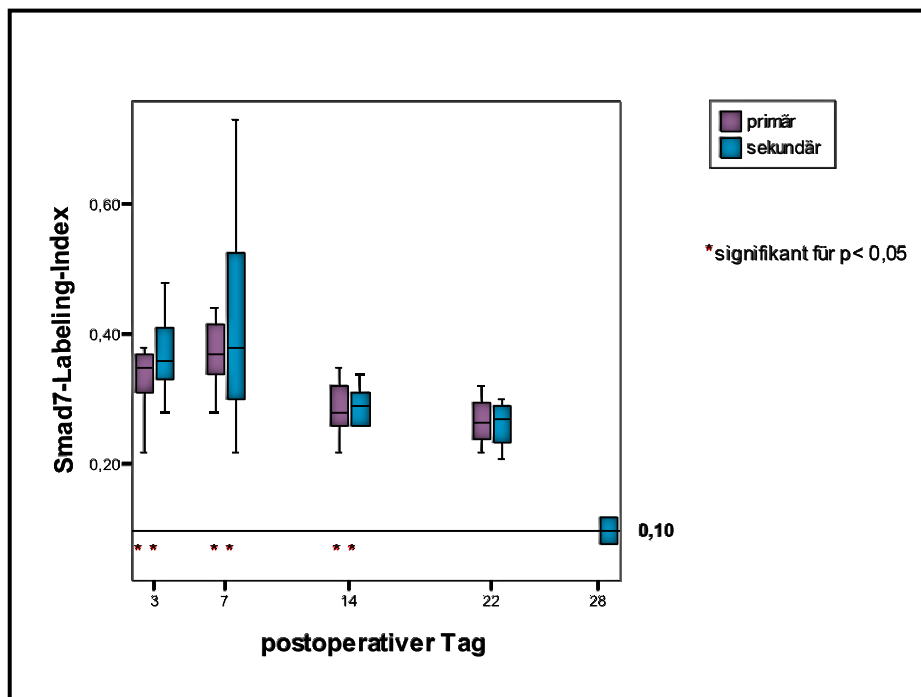


Abb. 6-34: Smad7-Expressionsprofil des primären und sekundären Modelles

Die Abbildung 6-34 zeigt das Smad7-Expressionsprofil für das primäre und sekundäre Heilungsmodell zwischen dem 3. und 28. postoperativen Tag. Darüber hinaus ist der Median der Kontrollen, der bei 0,10 liegt, als Referenzlinie eingezeichnet. Deutlich wird, dass in beiden Modellen der Anteil positiv gefärbter Zellen zunächst stieg und am 7. Tag sein Maximum erreichte. Im Anschluss sank der Index, bis am 28. Tag der Wert der Kontrollhäute erreicht wurde. Am 3., 7. und 14. Tag lag der Signifikanzwert unter dem 0,05-Niveau, d.h. es bestand sowohl zwischen den Medianen der primären Wundheilung/Kontrolle als auch zwischen den Medianen der sekundären Wundheilung/Kontrolle ein signifikanter Zusammenhang. Die einzelnen Ergebnisse sind in Tabelle 6-5 und Tabelle 6-6 aufgeführt.

Tab. 6-5: Smad7-Labeling-Index für die primäre und sekundäre Wundheilung

| | Median Smad7 primäre WH | Median Smad7 sekundäre WH |
|--------|----------------------------|------------------------------|
| Tag 3 | 0,35 | 0,36 |
| Tag 7 | 0,37 | 0,38 |
| Tag 14 | 0,28 | 0,29 |
| Tag 22 | 0,27 | 0,27 |
| Tag 28 | 0,10 | 0,10 |

Tab. 6-6: Signifikanzen des primären und sekundären WH-Modell und der Kontrollhäute

| | Signifikanz primär-sekundär | Signifikanz primär-Kontrolle | Signifikanz sekundär-Kontrolle |
|--------|--------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|
| Tag 3 | 0,387 | 0,000 * | 0,000 * |
| Tag 7 | 0,630 | 0,000 * | 0,000 * |
| Tag 14 | 0,937 | 0,000 * | 0,010 * |
| Tag 22 | 0,886 | 0,057 | 0,057 |
| Tag 28 | 1 | - | - |

* signifikant für $p \leq 0,05$

6.2 Auswertung

6.2.1 Fragestellung 1

Im Zuge dieser Fragestellung sollte geklärt werden, ob Zusammenhänge zwischen dem Ausmaß des Operationstraumas und dem Expressionsprofil des Smad7-Moleküles bestehen. Tabelle 6-7 zeigt die Korrelationen zwischen Smad7-Labeling-Index und Wundgröße für das primäre und sekundäre Heilungsmodell.

Tab. 6-7: Korrelation nach Pearson zwischen der Wundbreite und dem Smad7-LI

| | LI Smad7 - Wundbreite primär | LI Smad7 - Wundbreite sekundär |
|-------------|---------------------------------|-----------------------------------|
| N | 33 | 33 |
| Korrelation | 0,344 | 0,474 |
| Signifikanz | 0,050 | 0,005 |

Die Korrelationen sind in beiden Heilungsverläufen positiv und die Signifikanzwerte liegen unterhalb des 0,05-Niveaus, d.h. es kann von einem signifikanten Zusammenhang zwischen dem Smad7-Expressionsprofil und der Wundgröße ausgegangen werden. Zur Veranschaulichung werden beide Korrelationen in einem einfachen Streudiagramm dargestellt, Abb. 6-35 und 6-36.

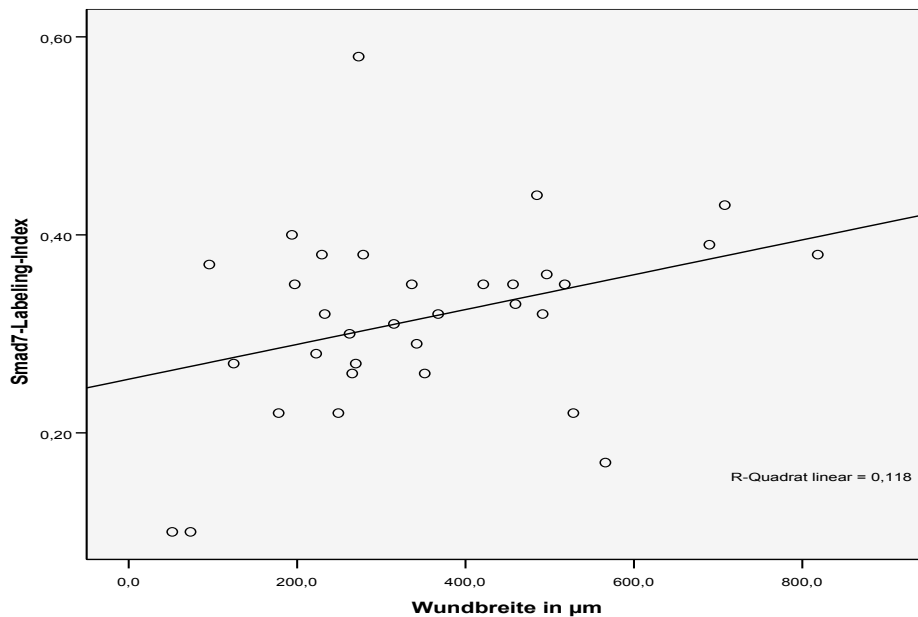


Abb. 6-35: Korrelation zwischen Wundbreite und Smad7-LI im primären Modell

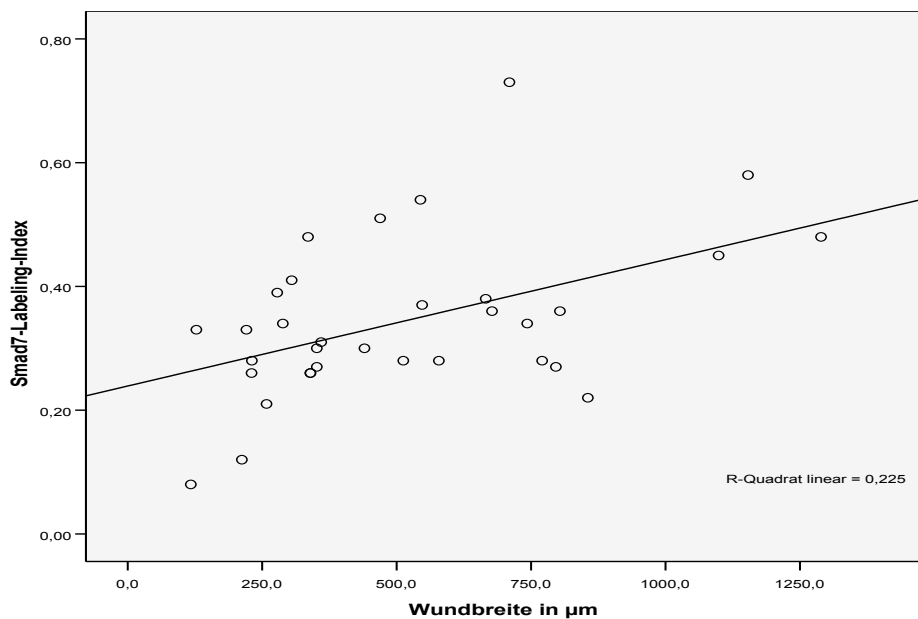


Abb. 6-36: Korrelation zwischen Wundbreite und Smad7-LI im sekundären Modell

6.2.2 Fragestellung 2

Diese Frage untersuchte Zusammenhänge zwischen dem Ausmaß des chirurgischen Traumas und aktivierter Smad2/3-Komplexe. In Tabelle 6-8 sind die Korrelationen zwischen dem Smad2/3-Labeling-Index und der Wundgröße für das primäre und sekundäre Heilungsmodell aufgeführt.

Tab. 6-8: Korrelation nach Pearson zwischen der Wundbreite und dem Smad2/3-LI

| | LI Smad2/3 - Wundbreite primär | LI Smad2/3 - Wundbreite sekundär |
|-------------|-----------------------------------|-------------------------------------|
| N | 33 | 33 |
| Korrelation | 0,357 | 0,457 |
| Signifikanz | 0,041 | 0,008 |

Beide Heilungsverläufe weisen eine positive Korrelation auf und die Signifikanzwerte liegen unterhalb des 0,05-Niveaus, d.h. es konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Smad2/3-Expressionsprofil und der Wund-ausdehnung nachgewiesen werden. Zur besseren Illustration werden beide Korrelationen in einem einfachen Streudiagramm dargestellt, Abb. 6-37 und 6-38.

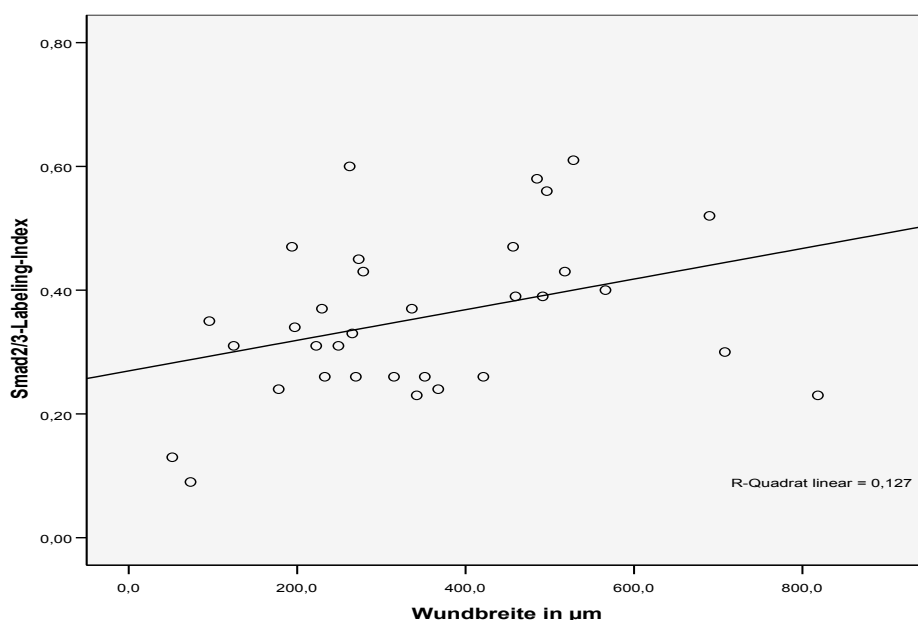


Abb. 6-37: Korrelation zwischen Wundbreite und Smad2/3-LI im primären Modell

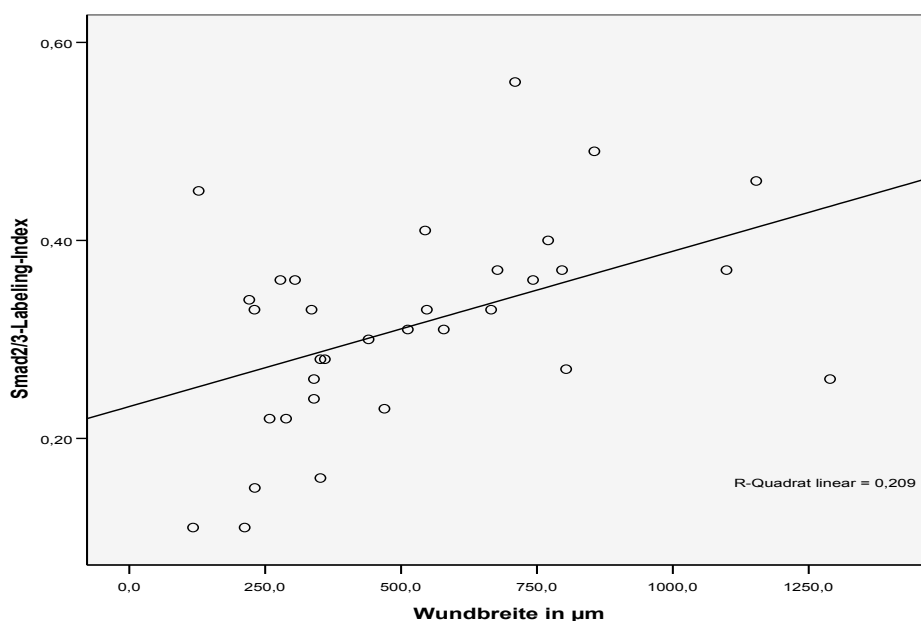


Abb. 6-38: Korrelation zwischen Wundbreite und Smad2/3-LI im sekundären Modell

6.2.3 Fragestellung 3

Diese Fragestellung überprüfte, ob Verbindungen zwischen der heilungsassoziierten Reepithelialisierung und dem Smad7 bzw. Smad2/3-Profil bestehen. In Tabelle 6-9 sind zunächst die Korrelationen zwischen dem Smad7-Labeling-Index und dem Epithelialisierungsgrad für das primäre und sekundäre Heilungsmodell aufgeführt.

Tab. 6-9: Korrelation nach Pearson zwischen der Epithelialisierung und dem Smad7-LI

| | LI Smad7 – Epithel primär | LI Smad7 – Epithel sekundär |
|-------------|------------------------------|--------------------------------|
| N | 33 | 33 |
| Korrelation | - 0,289 | - 0,371 |
| Signifikanz | 0,103 | 0,033 |

Die Korrelationen sind in beiden Heilungsverläufen negativ. Im sekundären Wundheilungsmodell liegt der Signifikanzwert unterhalb des 0,05-Niveaus, d.h. die Korrelation zwischen dem Smad7-Expressionsprofil und dem Epithelialisierungsgrad ist signifikant. Beim primären Modus wird das gewählte Signifikanzniveau von

$p \leq 0,05$ überschritten, somit kann ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Smad7-Labeling-Index und der Epithelialisierung ausgeschlossen werden. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt in einem einfachen Streudiagramm, Abb. 6-39 und Abb. 6-40.

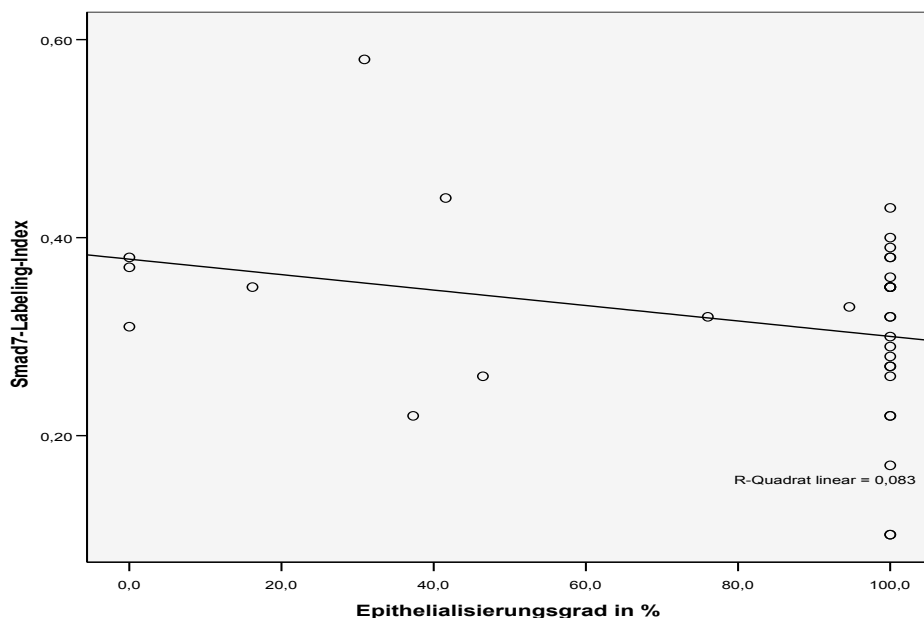


Abb. 6-39: Korrelation zwischen Epithelialisierung und Smad7-LI im primären Modell

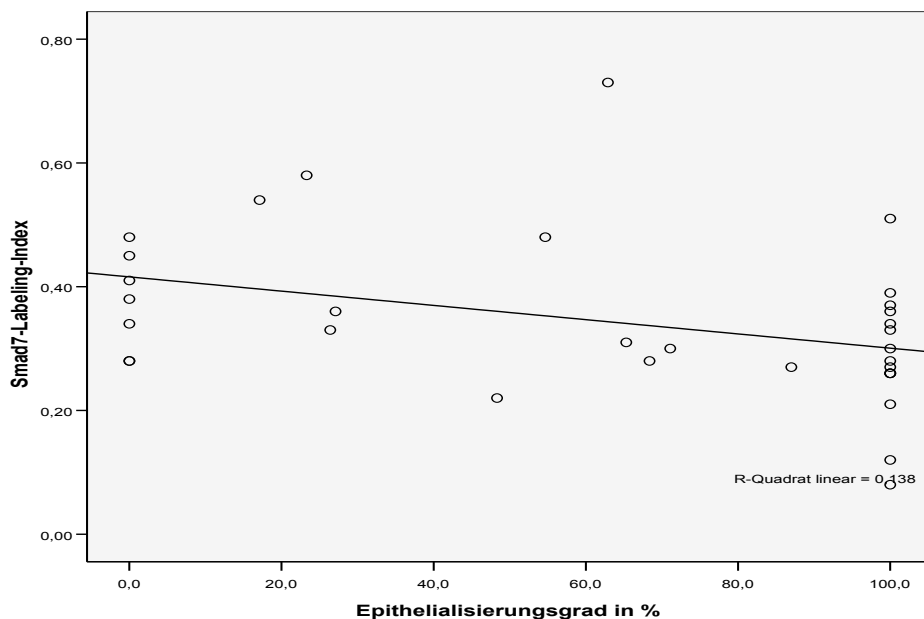


Abb. 6-40: Korrelation zwischen Epithelialisierung und Smad7-LI im sekundären Modell

In Tabelle 6-10 sind die Korrelationen zwischen dem Smad2/3-Labeling-Index und dem Epithelialisierungsgrad für das primäre und sekundäre Heilungsmodell ersichtlich.

Tab. 6-10: Korrelation nach Pearson zwischen der Epithelialisierung und dem Smad2/3-LI

| | LI Smad2/3 – Epithel primär | LI Smad2/3 – Epithel sekundär |
|-------------|--------------------------------|----------------------------------|
| N | 33 | 33 |
| Korrelation | - 0,151 | - 0,520 |
| Signifikanz | 0,402 | 0,002 |

Die beiden Wundheilungsmodelle weisen eine negative Korrelation auf. Im sekundären Wundheilungsmodell liegt der Signifikanzwert unterhalb des 0,05-Niveaus, d.h. die Korrelation zwischen dem Smad2/3-Expressionsprofil und dem Epithelialisierungsgrad ist signifikant. Beim primären Modus wird das gewählte Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ überschritten, somit gilt der Zusammenhang zwischen dem Smad2/3-Labeling-Index und der Epithelialisierung als nicht signifikant. Zur Veranschaulichung der Resultate dienen einfache Streudiagramme, Abb. 6-41 und 6-42.

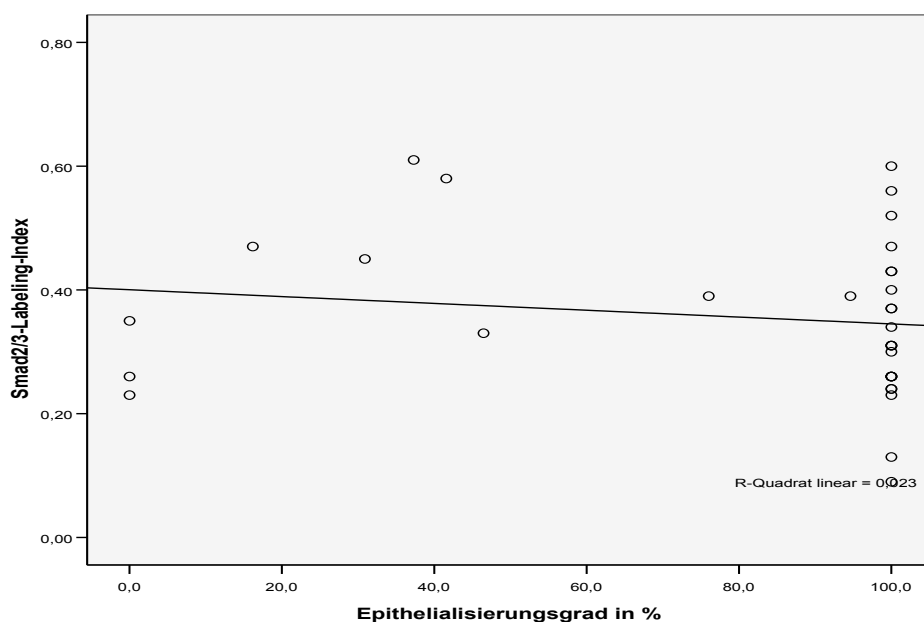


Abb. 6-41: Korrelation zwischen Epithelialisierung und Smad2/3-LI im primären Modell

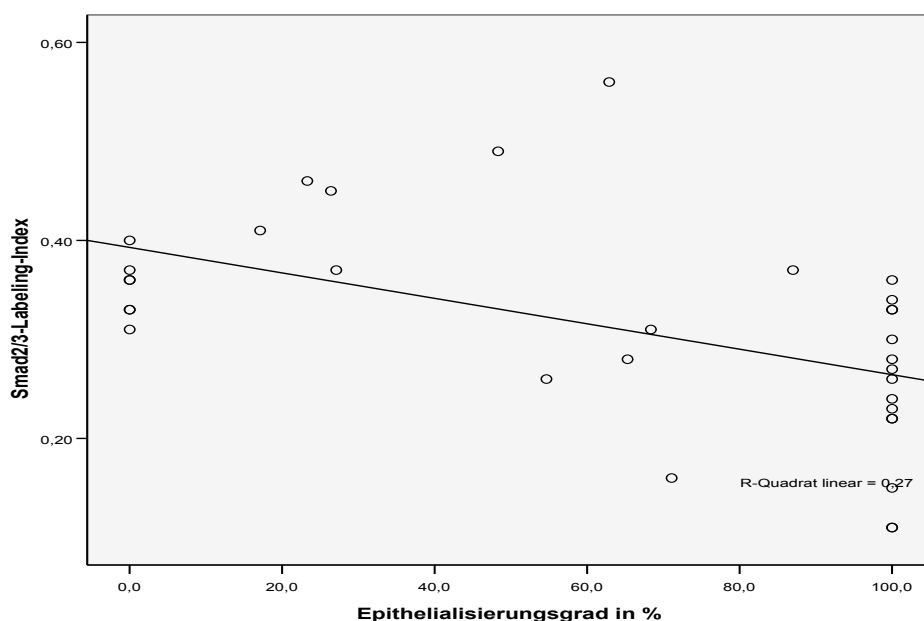


Abb. 6-42: Korrelation zwischen Epithelialisierung und Smad2/3-LI im sekundären Modell

6.2.4 Fragestellung 4

Im Zuge dieser Fragestellung sollte geklärt werden, ob zwischen der Wundgröße und der Reepithelialisierung ein Zusammenhang besteht. In Tabelle 6-11 sind die Korrelationen für das primäre und sekundäre Heilungsmodell dargestellt.

Tab. 6-11: Korrelation nach Pearson zwischen der Reepithelialisierung und Wundbreite

| | Reepithelialisierung- Wundbreite primär | Reepithelialisierung- Wundbreite sekundär |
|-------------|--|--|
| N | 33 | 33 |
| Korrelation | - 0,192 | - 0,431 |
| Signifikanz | 0,285 | 0,012 |

Die Korrelationen sind in beiden Heilungsverläufen negativ. Im sekundären Wundheilungsmodell liegt der Signifikanzwert unterhalb des 0,05-Niveaus, d.h. die Korrelation zwischen der Wundfläche und dem Epithelialisierungsgrad ist signifikant. Beim primären Modus wird das gewählte Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ überschritten. Somit kann ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Wundgröße und der Epithelialisierung ausgeschlossen werden. Die Darstellung

der Ergebnisse erfolgt in einem einfachen Streudiagramm, Abb. 6-43 und Abb. 6-44.

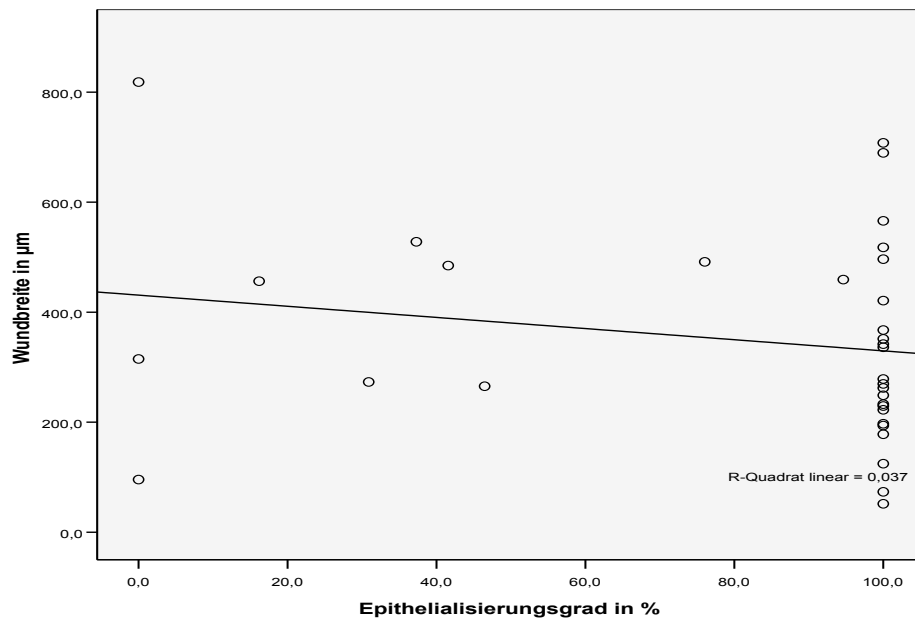


Abb. 6-43: Korrelation zwischen Epithelialisierung und Wundbreite im primären Modell

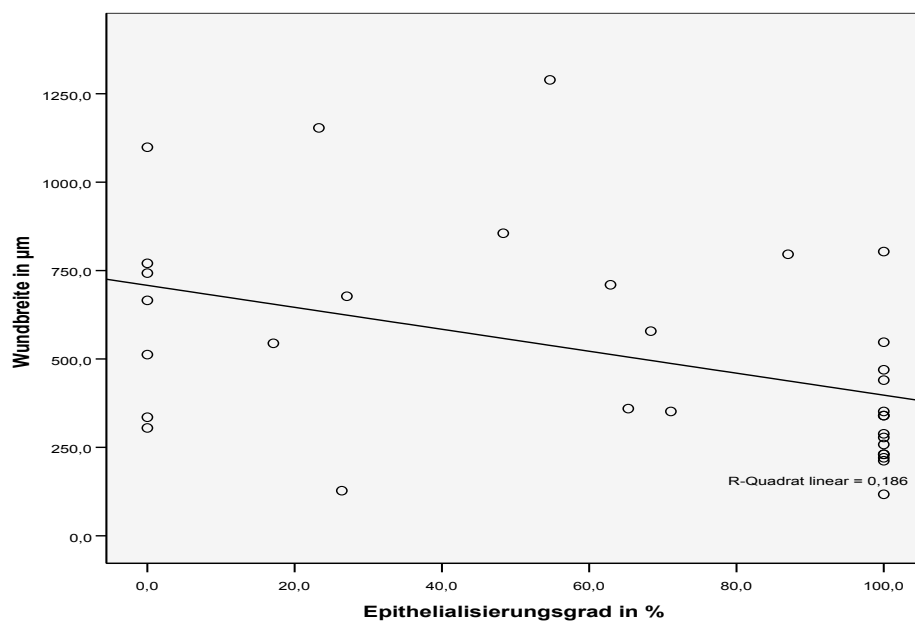


Abb. 6-44: Korrelation zwischen Epithelialisierung und Wundbreite im sekundären Modell

6.2.5 Fragestellung 5

In diesem Abschnitt wurde zusätzlich geprüft, ob zwischen dem Smad7- und Smad2/3- Expressionsprofil Zusammenhänge bestehen. In Tabelle 6-12 sind die Korrelationen für das primäre und sekundäre Heilungsmodell aufgeführt.

Tab. 6-12: Korrelation nach Pearson zwischen Smad7-LI und Smad2/3-LI

| | Smad7-Smad2/3 primär | Smad7-Smad2/3 sekundär |
|-------------|-------------------------|---------------------------|
| N | 33 | 33 |
| Korrelation | 0,468 | 0,590 |
| Signifikanz | 0,006 | 0,000 |

Die Korrelationen sind in beiden Heilungsverläufen positiv und die Signifikanzwerte liegen unterhalb des 0,05-Niveaus, d.h. es kann von einem signifikanten Zusammenhang zwischen dem Smad7-Expressionsprofil und Smad2/3-Expressionsprofil ausgegangen werden. Zur Veranschaulichung werden beide Korrelationen in einem einfachen Streudiagramm dargestellt, Abb. 6-45 und Abb. 6-46.

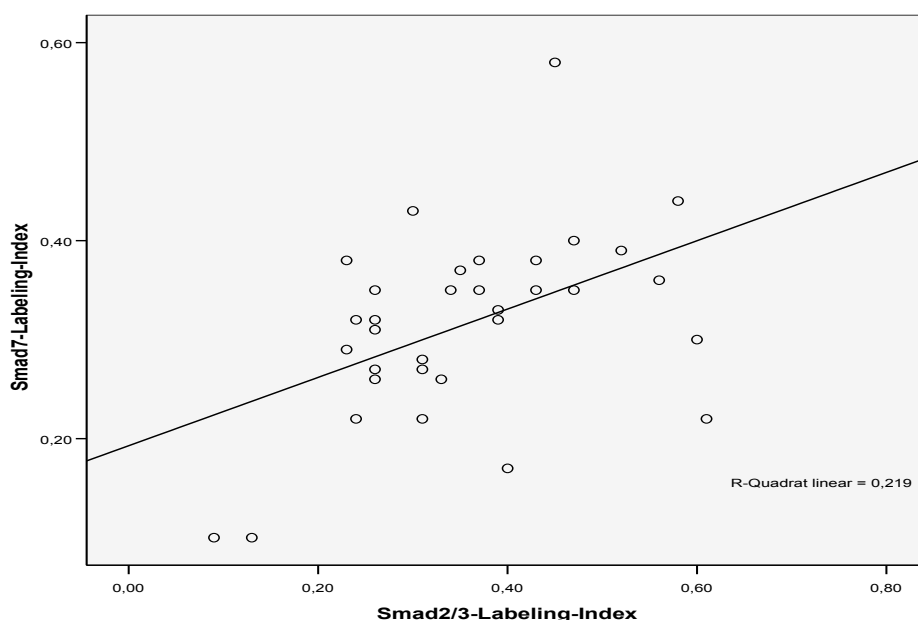


Abb. 6-45: Korrelation zwischen Smad7-LI und Smad2/3-LI im primären Modell

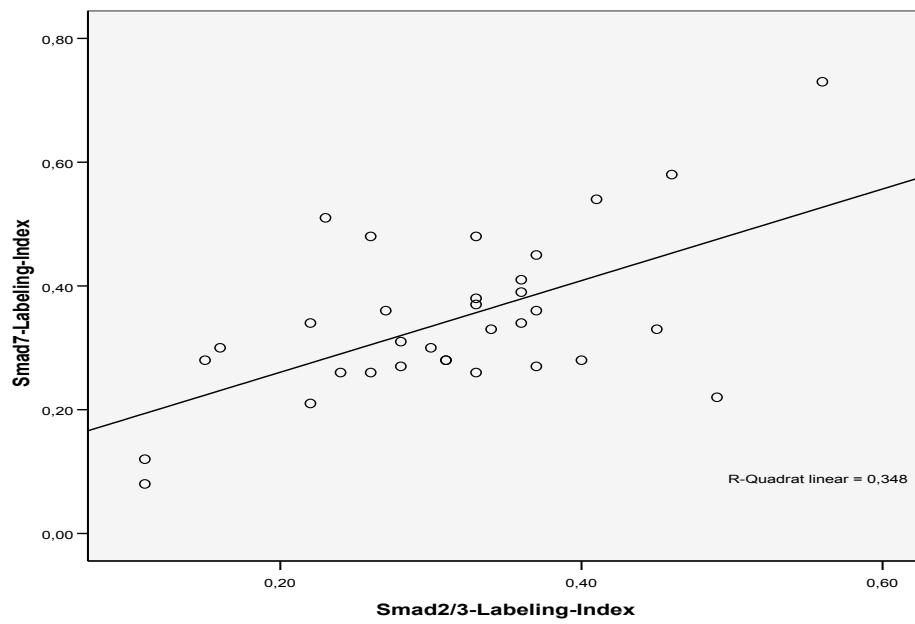


Abb. 6-46: Korrelation zwischen Smad7-LI und Smad2/3-LI im sekundären Modell

7 Diskussion

7.1 Interpretation der Ergebnisse

Die hohe Relevanz von Wundheilungsstörungen und die daraus resultierende sozioökonomische Belastung des Gesundheitssystems erfordert ein adäquates Therapiekonzept. Wie auch bei anderen Erkrankungen steht eine vollständige Genesung und schnelle Rehabilitation der Patienten im Mittelpunkt, um Kosten zu sparen und um die Beeinträchtigungen der Patienten zu minimieren. In der gegenwärtigen Studie war von primärem Interesse darzustellen, inwieweit die heilungsassoziierte Wundkontraktion von der Funktion TGF-betas und der Reepithelialisierung während der Wundheilung beeinflusst wird und ob Unterschiede im Expressionsprofil der Smad-Proteine zwischen primären und sekundären Wundheilungsmodell existieren. In dieser Untersuchung wurde die Aktivität von TGF-beta indirekt über dessen intrazelluläre Mediatoren Smad2/3 und Smad7 ermittelt, da Feng et al. bereits 2005 belegten, dass TGF-beta 1 das alpha-SMA über den Smad-Pathway aktiviert (Feng und Derynck 2005). Als Indikator für die Myofibroblastentätigkeit dient die histomorphometrische Auswertung der Wundbreite.

In dieser Untersuchung nimmt die Wundbreite sowohl im primären als auch im sekundären Wundbereich mit jedem späteren Zeitpunkt der Probenentnahme ab (Tabelle 6-1). TGF-beta und die Spannung der Wundumgebung fördern die Differenzierung von Myofibroblasten (Tomasek et al. 2002, Werner und Grose 2003). Die anhaltende Aktivität dieser kontraktile Zellen führt dann sukzessiv zu einer Reduzierung der Wundbreite (Hinz et al. 2001b). Die Zugspannung stellte in der gegenwärtigen Studie kein Untersuchungsparameter dar, aber die Ergebnisse bestätigen gleichwohl den Zusammenhang zwischen Wundkontraktion und TGF-beta-Aktivität (Tabelle 6-8). Besonders an den postoperativen Tagen 3, 7 und 14 konnte ein gesteigener Smad2/3-Spiegel in den primären und sekundären Proben nachgewiesen werden, der im Vergleich zu den Kontrollhäuten signifikant höher ist (Tabelle 6-4). Die Werte lassen vermuten, dass TGF-beta die Wundkontraktion fördert, aber sie lassen keine Rückschlüsse zu, ob weitere Faktoren zur Reduktion der Wunde beigetragen haben. Bereits frühere Studien zeigten, dass auch andere Zytokine wie Angiotensin-2, Endothelin-1 und Thrombin positiv auf die

Wundkontraktion wirken können. Es ist allerdings unklar, ob sie die Funktion TGF-betas forcieren oder die Spannung im Bereich der Wunde verändern (Bogatkevich et al. 2003, Shephard et al. 2004a, Shi-Wen et al. 2004, Swaney et al. 2005). Vergleicht man die Wundbreiten der offenen und geschlossenen Wundheilung miteinander, dann liegen die Mediane der sekundären Wundheilung an jedem Tag der Probenentnahme über denen des primären Modelles. Ein signifikanter Unterschied konnte ausschließlich für Tag 7 nachgewiesen werden (Tabelle 6-1). Eine Erklärung für diese leicht verzögerte Wundkontraktion könnte der im Vergleich zum primären Heilungsmodus reduzierte Smad2/3-Level sein, der eine herabgesetzte TGF-beta-Aktivität widerspiegelt (Tabelle 6-3). Der Smad2/3-Labeling-Index war im sekundären Modell zwar niedriger als im primären Heilungsmodus, signifikante Unterschiede waren allerdings nicht nachweisbar. Andere Einflussgrößen wie eine erhöhte Entzündungsantwort aufgrund von Verunreinigungen oder die Bedingungen in der Wundumgebung (z.B. Spannung, Sauerstoffgehalt) könnten ebenfalls Ursache einer verzögerten Wundkontraktion im sekundären Modell sein (Klinger et al. 2011).

Die Wundkontraktion trägt entscheidend dazu bei, dass sich im Laufe der Wundheilung die Wundränder annähern. Normalerweise sterben die Myofibroblasten nach Verschluss des Gewebes den programmierten Zelltod. Bleibt die Apoptose allerdings aus oder der TGF-beta-Spiegel dauerhaft erhöht, sind hypertrophe Narben und Fibrosen die Folge (Desmouliere et al. 1995, Nedelec et al. 2000). Die Ergebnisse von Moulin et al. bestätigen, dass Myofibroblasten in hypertrophen Narben weniger sensibel auf den Apoptoseinduktor Bax reagieren (Moulin et al. 2004). Eine mögliche Ursache könnte der in Narben stark erhöhte TGF-beta-Spiegel sein (Ghahary et al. 1993, Lin et al. 1995). Um eine anhaltende Aktivität zu vermeiden, sinkt während der physiologischen Wundheilung die TGF-beta-Aktivität. Diese Aktivitätsreduktion fördert die Proliferation der Keratinozyten, die dann zeitgerecht Interleukin-1 sezernieren. IL-1 antagonisiert die TGF-beta1-vermittelte alpha-SMA-Expression. Dadurch stagniert die Wundkontraktion und Narben werden vermieden (Kanangat et al. 2006, Shephard et al. 2004a). Diesen Zusammenhang geben auch die Ergebnisse dieser Untersuchung wieder. Sowohl für die primäre als auch für die

sekundäre Wundheilung konnte eine positive Korrelation zwischen der Wundbreite und dem Smad2/3-Expressionsprofil (primär 0,357/ sekundär 0,457) nachgewiesen werden, die auf dem Niveau von $p \leq 0,05$ für die sekundäre Wundheilung als statistisch signifikant gilt (Tab. 6-8). Das bedeutet, dass zu Beginn der Heilung bei großen Wundflächen auch mit einem hohen TGF-beta-Spiegel zu rechnen ist und dass mit reduzierter TGF-beta-Aktivität die Wundkontraktion in geringerem Ausmaß stattfindet, weil die Epithelialisierung voranschreitet. Da TGF-beta über die Epithelialisierung indirekt auf die Myofibroblastentätigkeit wirkt, war der Epithelialisierungsgrad ebenfalls Gegenstand dieser Untersuchung. Ab dem 7. Tag im primären beziehungsweise ab dem 22. Tag im sekundären Modell weisen die Wunden einen Epithelialisierungsgrad von fast 100 Prozent auf (Tab. 6-2). Die Korrelation zwischen Epithelialisierung und Smad2/3 ist in beiden Heilungsvarianten negativ (primär -0,151/ sekundär -0,520), allerdings ist nur im sekundären Heilungsverlauf ein signifikanter Zusammenhang nachweisbar (Tab. 6-10). Hieraus lässt sich ableiten, dass mit sinkendem Smad2/3-Labeling-Index die Keratinozytenaktivität zunimmt und der Epithelialisierungsgrad steigt. Diese Bildung der Epitheldecke führt, eventuell über den zuvor erwähnten Interleukin-1-abhängigen Mechanismus, zu einer reduzierten Myofibroblastentätigkeit. Daher sind weniger Narben zu erwarten. Untersucht man den Zusammenhang Epithelialisierung-Wundbreite, besteht ebenfalls eine negative Korrelation im offenen und geschlossenen Heilungsmodus (primär -0,192/ sekundär -0,431). Dieser Zusammenhang ist ausschließlich für das sekundäre Modell auf dem Niveau von $p \leq 0,05$ statistisch signifikant (Tab. 6-11). Alles in allem bestätigen die Ergebnisse die Annahme, dass TGF-beta mittels seiner intrazellulären Mediatoren (Smad2/3) positiv auf die Wundkontraktion wirkt und dass mit steigender Reepithelialisierung eine anhaltende Myofibroblastenfunktion unterdrückt wird. Dass die Unterbrechung der TGF-beta-Signalkaskade durch IL-1 provoziert wird ist allenfalls eine Vermutung und lässt sich anhand der untersuchten Parameter nicht bestätigen.

Einen weiteren wichtigen Parameter dieser Studie stellt das Smad7- Molekül dar, das über die Inhibition der R-Smad-Aktivierung eine Down-Regulation von TGF-beta bewirkt (Heldin et al. 1997). Die Ergebnisse zeigen, dass die Smad7-Aktivität

besonders an Tag 7 hohe Werte aufweist (Tab. 6-5). Smad2/3 hingegen hat sein Aktivitätsmaximum bereits an Tag 3 (Tab. 6-3). Diese Unterschiede im Expressionsprofil von Smad2/3 und Smad7 führen wiederum zu einer unterschiedlichen TGF-beta-Aktivität. Zu Beginn der Heilung ist ein hoher TGF-beta-Level sinnvoll, denn TGF-beta zieht Entzündungszellen zur Reinigung der Wunde und Fibroblasten zur Apposition von EZM an (Narayanan et al. 1989, Wahl et al. 1987). Diese Vorgänge stärken insbesondere die Festigkeit der Wunde (Brown et al. 1988). Im späteren Verlauf der Wundheilung muss allerdings eine Unterbrechung der Signalweiterleitung erfolgen, damit eine Reepithelialisierung der Wunde ermöglicht wird und eine weitere Wundkontraktion ausbleibt. TGF-beta fördert zwar die Reifung der Keratinozyten, die Proliferation dieser Zellen wird allerdings bei hoher TGF-beta-Aktivität unterdrückt (Mansbridge und Hanawalt 1988). Andere Studien bestätigen ebenfalls, dass sich eine Blockade der TGF-beta-Rezeptoren oder die Deletion des R-Smads 3 (Smad-3-KO) positiv auf die Reepithelialisierung auswirken und die Wundheilung beschleunigen (Amendt et al. 2002, Ashcroft et al. 1999). Die Ergebnisse der gegenwärtigen Untersuchung zeigen, dass in den Proben von Tag 7 der Smad7-Spiegel am Höchsten ist und dass an jedem darauffolgenden Tag der Biopsatgewinnung die Smad7-Aktivität geringer ausfällt (Tab. 6-5). Demzufolge werden während der Proliferationsphase die TGF-beta Signale blockiert und es kann verstärkt die Bildung einer Epitheldecke erfolgen. Beide Smad-Proteine (Smad2/3 und Smad7) weisen zu späteren Zeitpunkten der Probenentnahme (Tag 14, 22 und 28) einen geringeren Spiegel als an Tag 3 und 7 auf. In den Proben des 28. postoperativen Tages sind die Werte ähnlich denen der Kontrollhäute (Tab. 6-3 und Tab. 6-5). Das zeigt, dass die Wundheilung im Wesentlichen abgeschlossen ist und eine weitere Aktivität der Zytokine und intrazellulären Mediatoren nicht erforderlich ist. Signifikante Unterschiede zwischen dem Smad7-Labeling-Index der primären und sekundären Wundheilung sind nicht nachweisbar. An Tag 3, 7 und 14 sind die Werte des offenen und geschlossenen Modelles allerdings signifikant höher als die der Kontrollhäute ($p \leq 0,05$) (Tab. 6-6). Die Werte weisen also eine gesteigerte Aktivität im Vergleich zur unverwundeten Haut auf. Im Zuge der Untersuchung wurden außerdem statistisch signifikante, positive Korrelationen zwischen dem Smad7-Labeling-Index und der Wundbreite (primär 0,344/ sekundär 0,474) sowie

eine negative Korrelation zwischen dem Smad7-Labeling-Index und der Epithelialisierung (sekundär -0,374) im offenen Modell nachgewiesen (Tab. 6-7 und Tab. 6-9). Die Korrelationen sagen aus, dass mit sinkendem Smad7-Labeling-Index auch die Wundfläche weiter abnahm und die Epithelialisierung zunahm. Dieses Ergebnis widerspricht den zuvor erwähnten Zusammenhängen. Vermutlich liegt es daran, dass das Zeitintervall der Probenentnahme unglücklich gewählt wurde und hauptsächlich die Down-Regulation widerspiegelt, die generell am Ende jeder Wundheilung steht und neben Smad7 auch andere intrazelluläre Mediatoren betrifft. Weitere Probenentnahmen um Tag 7 herum, an dem Smad7 sein Maximum hat, würden den Anstieg der I-Smad-Aktivität wahrscheinlich besser darstellen und hätten vermutlich zu einem anderen Ergebnis geführt.

Weiterhin war von Interesse, ob zwischen den Expressionsprofilen von Smad2/3 und Smad7 Verknüpfungen bestehen. Sowohl für das primäre als auch für das sekundäre Modell konnten statistisch signifikante positive Korrelationen (primär 0,468/ sekundär 0,590) nachgewiesen werden (Tab. 6-12). Diese Werte sind allerdings wenig aussagekräftig, da beide Expressionsprofile vor allem die Abnahme der Aktivität ab Tag 7 demonstrieren. Auch hier wäre es günstiger das Zeitintervall der Probenentnahme zu Beginn der Wundheilung enger zu stecken, denn gerade in den ersten Stunden nach Verletzung erfolgt die Aktivierung vieler Heilungsmechanismen. Erst dadurch erhält man ein konkretes Expressionsprofil, das einen Vergleich zwischen R-Smad und I-Smad erlaubt.

7.2 Methodenkritik

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurden zur Untersuchung von Wundheilungsvorgängen 55 Ratten des Inzucht-Stammes C57/BL6 Jax verwendet. Dabei muss beachtet werden, dass Ratten eine 4-6fach höhere Stoffwechselrate als der Mensch aufweisen und daher Untersuchungsergebnisse nur bedingt übertragbar sind (Waynforth und Flecknell 1992). Um eine gewisse Vergleichbarkeit zwischen den Versuchstieren zu gewährleisten, wurden sie unter standardisierten Bedingungen gehalten. Die Anzahl der Versuchstiere weist allerdings an den verschiedenen Tagen der Probenentnahme Differenzen auf. Zur Vermeidung von

Ungenauigkeiten sollte die Probenmenge einander entsprechen und möglichst groß gewählt werden. Im Zuge der Ergebnisauswertung gestaltete es sich schwierig anhand der gesammelten Daten ein exaktes Expressionsprofil der Smad2/3- und Smad7-Proteine zu erstellen. Daher sollte in folgenden Untersuchungen das Zeitintervall der Probenentnahme enger gesteckt werden. Um Beeinträchtigungen des Färbeergebnisses zu vermeiden wurden die Schnitte besonders sorgfältig aufbereitet (z.B. möglichst geringe Schichtdicke, Demaskierung durch Trypsin). Obwohl die ABC (Avidin-Biotin-Komplex)-Methode im Vergleich zu anderen Verfahren eine hohe Sensitivität aufweist, sind mit dieser Analyse auch Nachteile verbunden (Hsu et al. 1981). Es ist nicht möglich zur Signalverstärkung eine Wiederholung durchzuführen und die großen Moleküle der ABC-Methode können sterische Hinderungen verursachen, die ein positives Signal undeutlich werden lassen. Weiterhin ist eine quantitative Aussage über die Proteinmenge nicht möglich. Das Verfahren gibt nur den Expressionsgrad wieder, der mittels Labeling-Index vergleichend interpretiert wurde. Außerdem erfolgen die Wechselwirkungen zwischen den Antigenen und Antikörpern in Abhängigkeit von Konzentrationen, sodass die Immunhistochemie zur alleinigen Quantifizierung nicht ausreicht. Zusätzlich wäre das Durchführen von DNA/RNA-Analysen sinnvoll. Trotz aller Bemühungen um Objektivität unterliegen die Beurteilung immunhistochemischer Färbungen und die histomorphometrische Auswertung subjektiven Einflüssen und sind deshalb als semiquantitativ zu bezeichnen.

8 Schlussfolgerungen und Ausblick

Die Wundheilung stellt einen fundamentalen Mechanismus für das Überleben des menschlichen Organismus dar. Wünschenswert wäre in jedem Fall eine Regeneration des Defektes durch einen gleichwertigen Gewebeersatz (*restitutio ad integrum*). Ziel der vorliegenden Studie war die heilungsassoziierte Wundkontraktion und ihre Einflussgrößen im Zusammenhang zu betrachten und Unterschiede zwischen der primären und sekundären Wundheilungsvariante aufzudecken. Die Ergebnisse zeigen, dass die Immunhistochemie zum intrazellulären Proteinnachweis und die Histomorphometrie wertvolle Untersuchungsmethoden sind. Dadurch konnte nachgewiesen werden, dass die Aktivität der Myofibroblasten von dem TGF-beta-Spiegel und dem Fortschreiten der Epithelialisierung abhängig ist. Ziel weiterführender Studien könnte es sein, die Zugspannung als Parameter zu ergänzen um das Wechselspiel der drei Einflussgrößen (TGF-beta, Epithelialisierung, mechanische Umgebung) in der Gesamtheit zu erfassen. Die gewonnenen Daten zeigen, dass Wunden, die der freien Granulation überlassen werden, verzögert heilen d.h. Wundkontraktion und Epithelialisierung finden später statt. Da signifikante Unterschiede zwischen beiden Heilungsverläufen weder im Smad2/3- noch im Smad7- Expressionsprofil nachgewiesen werden konnten, gibt es wahrscheinlich andere Ursachen. Denkbar wären voneinander abweichende Bedingungen in der Wundumgebung wie z.B. Sauerstoffgehalt, Bakterienanzahl oder mechanische Spannung. Diese Parameter könnten Bestandteil zukünftiger Studien sein. Weiterhin wäre es wichtig in folgenden Untersuchungen das TGF-beta-Molekül direkt nachzuweisen, da es neben dem Smad-Pathway auch über verschiedene non-Smad-Pathways aktiviert werden kann (Hocevar et al. 1999). Ein weiterer Vorteil wäre, dass man auf RNA-Ebene die verschiedenen Isoformen TGF-betas und deren Effekte getrennt voneinander betrachten könnte. Shah et al. bewiesen in ihren Studien, dass die verschiedenen TGF-beta- Moleküle unterschiedlichen Einfluss auf die Ausbildung von Narben besitzen (Shah et al. 1994, Shah et al. 1995).

Die Ergebnisse zeigen, dass die Betrachtung des TGF-beta-Aktivitätslevels unerlässlich für die Entwicklung einer antifibrotischen Therapie ist. Um in Zukunft

allerdings Medikamente und Therapieansätze zur Vermeidung von Narben und chronischen Wunden zu entwickeln, muss die Komplexität der Zytokin-Interaktionen in Abhängigkeit von den Wundeigenschaften erst noch im Detail entschlüsselt werden.

Quellen

- Aarabi S, Bhatt KA, Shi Y, Paterno J, Chang EI, Loh SA, Holmes JW, Longaker MT, Yee H, Gurtner GC. 2007. Mechanical load initiates hypertrophic scar formation through decreased cellular apoptosis. *FASEB J* 21 (12), 3250-3261.
- Amendt C, Mann A, Schirmacher P, Blessing M. 2002. Resistance of keratinocytes to TGFbeta-mediated growth restriction and apoptosis induction accelerates re-epithelialization in skin wounds. *J Cell Sci* 115 (Pt 10), 2189-2198.
- Ashcroft GS, Yang X, Glick AB, Weinstein M, Letterio JL, Mizel DE, Anzano M, Greenwell-Wild T, Wahl SM, Deng C, Roberts AB. 1999. Mice lacking Smad3 show accelerated wound healing and an impaired local inflammatory response. *Nat Cell Biol* 1 (5), 260-266.
- Bogatkevich GS, Tourkina E, Abrams CS, Harley RA, Silver RM, Ludwicka-Bradley A. 2003. Contractile activity and smooth muscle alpha-actin organization in thrombin-induced human lung myofibroblasts. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 285 (2), L334-343.
- Brown GL, Curtsinger LJ, White M, Mitchell RO, Pietsch J, Nordquist R, von Fraunhofer A, Schultz GS. 1988. Acceleration of tensile strength of incisions treated with EGF and TGF-beta. *Ann Surg* 208 (6), 788-794.
- Clark RAF. 1996. *The molecular and cellular biology of wound repair*. (2. Aufl). New York u.a.: Plenum Press.
- Colwell AS, Longaker MT, Lorenz HP. 2003. Fetal wound healing. *Front Biosci* 8, s1240-1248.
- Datto MB, Frederick JP, Pan L, Borton AJ, Zhuang Y, Wang XF. 1999. Targeted disruption of Smad3 reveals an essential role in transforming growth factor beta-mediated signal transduction. *Mol Cell Biol* 19 (4), 2495-2504.
- Derynck R, Zhang Y, Feng XH. 1998. Smads: transcriptional activators of TGF-beta responses. *Cell* 95 (6), 737-740.
- Desmouliere A, Chaponnier C, Gabbiani G. 2005. Tissue repair, contraction, and the myofibroblast. *Wound Repair Regen* 13 (1), 7-12.
- Desmouliere A, Redard M, Darby I, Gabbiani G. 1995. Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. *Am J Pathol* 146 (1), 56-66.
- Eckes B, Krieg T. 2004. Regulation of connective tissue homeostasis in the skin by mechanical forces. *Clin Exp Rheumatol* 22 (3 Suppl 33), S73-76.
- Feng XH, Derynck R. 2005. Specificity and versatility in tgfbeta signaling through Smads. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21, 659-693.
- Gabbiani G. 2003. The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. *J Pathol* 200 (4), 500-503.
- Ghahary A, Shen YJ, Scott PG, Gong Y, Tredget EE. 1993. Enhanced expression of mRNA for transforming growth factor-beta, type I and type III procollagen in human post-burn hypertrophic scar tissues. *J Lab Clin Med* 122 (4), 465-473.
- Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT. 2008. Wound repair and regeneration. *Nature* 453 (7193), 314-321.
- Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P. 1997. TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 390 (6659), 465-471.
- Hinz B, Mastrangelo D, Iselin CE, Chaponnier C, Gabbiani G. 2001a. Mechanical tension controls granulation tissue contractile activity and myofibroblast differentiation. *Am J Pathol* 159 (3), 1009-1020.

- Hinz B, Celetta G, Tomasek JJ, Gabbiani G, Chaponnier C. 2001b. Alpha-smooth muscle actin expression upregulates fibroblast contractile activity. *Mol Biol Cell* 12 (9), 2730-2741.
- Hocevar BA, Brown TL, Howe PH. 1999. TGF-beta induces fibronectin synthesis through a c-Jun N-terminal kinase-dependent, Smad4-independent pathway. *EMBO J* 18 (5), 1345-1356.
- Hsu SM, Raine L, Fanger H. 1981. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 29 (4), 577-580.
- Kanangat S, Postlethwaite AE, Higgins GC, Hasty KA. 2006. Novel functions of intracellular IL-1ra in human dermal fibroblasts: implications in the pathogenesis of fibrosis. *J Invest Dermatol* 126 (4), 756-765.
- Kingsley DM. 1994. The TGF-beta superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes Dev* 8 (2), 133-146.
- Klinger A, Mueller CK, Schultze-Mosgau S. 2011. Funktionelle Rolle von Smad2 in der topischen Inflammation, Granulationsgewebeformation und Konsolidierung im Rahmen cutaner Wundheilung
- Lanning DA, Nwomeh BC, Montante SJ, Yager DR, Diegelmann RF, Haynes JH. 1999. TGF-beta1 alters the healing of cutaneous fetal excisional wounds. *J Pediatr Surg* 34 (5), 695-700.
- Levenson SM, Geever EF, Crowley LV, Oates JF, 3rd, Berard CW, Rosen H. 1965. The Healing of Rat Skin Wounds. *Ann Surg* 161, 293-308.
- Lin RY, Sullivan KM, Argenta PA, Meuli M, Lorenz HP, Adzick NS. 1995. Exogenous transforming growth factor-beta amplifies its own expression and induces scar formation in a model of human fetal skin repair. *Ann Surg* 222 (2), 146-154.
- Lovvorn HN, 3rd, Cheung DT, Nimni ME, Perelman N, Estes JM, Adzick NS. 1999. Relative distribution and crosslinking of collagen distinguish fetal from adult sheep wound repair. *J Pediatr Surg* 34 (1), 218-223.
- Mansbridge JN, Hanawalt PC. 1988. Role of transforming growth factor beta in the maturation of human epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol* 90 (3), 336-341.
- Marenzana M, Wilson-Jones N, Mudera V, Brown RA. 2006. The origins and regulation of tissue tension: identification of collagen tension-fixation process in vitro. *Exp Cell Res* 312 (4), 423-433.
- Martin P. 1997. Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. *Science* 276 (5309), 75-81.
- Massague J. 1998. TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem* 67, 753-791.
- McGee GS, Broadley KN, Buckley A, Aquino A, Woodward SC, Demetriou AA, Davidson JM. 1989. Recombinant transforming growth factor beta accelerates incisional wound healing. *Curr Surg* 46 (2), 103-106.
- Meno C, Saijoh Y, Fujii H, Ikeda M, Yokoyama T, Yokoyama M, Toyoda Y, Hamada H. 1996. Left-right asymmetric expression of the TGF beta-family member lefty in mouse embryos. *Nature* 381 (6578), 151-155.
- Mescher AL, Neff AW. 2005. Regenerative capacity and the developing immune system. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 93, 39-66.
- Moulin V, Laroche S, Langlois C, Thibault I, Lopez-Valle CA, Roy M. 2004. Normal skin wound and hypertrophic scar myofibroblasts have differential responses to apoptotic inducers. *J Cell Physiol* 198 (3), 350-358.
- Narayanan AS, Page RC, Swanson J. 1989. Collagen synthesis by human fibroblasts. Regulation by transforming growth factor-beta in the presence of other inflammatory mediators. *Biochem J* 260 (2), 463-469.
- Nedelec B, Ghahary A, Scott PG, Tredget EE. 2000. Control of wound contraction. Basic and clinical features. *Hand Clin* 16 (2), 289-302.
- Roberts AB. 1998. Molecular and cell biology of TGF-beta. *Miner Electrolyte Metab* 24 (2-3), 111-119.

- Roberts AB, Flanders KC, Heine UI, Jakowlew S, Kondaiah P, Kim SJ, Sporn MB. 1990. Transforming growth factor-beta: multifunctional regulator of differentiation and development. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 327 (1239), 145-154.
- Schaffer M, Becker HD. 1999. [Immune regulation of wound healing]. *Chirurg* 70 (8), 897-908.
- Shah M, Foreman DM, Ferguson MW. 1994. Neutralising antibody to TGF-beta 1,2 reduces cutaneous scarring in adult rodents. *J Cell Sci* 107 (Pt 5), 1137-1157.
- Shah M, Foreman DM, Ferguson MW. 1995. Neutralisation of TGF-beta 1 and TGF-beta 2 or exogenous addition of TGF-beta 3 to cutaneous rat wounds reduces scarring. *J Cell Sci* 108 (Pt 3), 985-1002.
- Shephard P, Hinz B, Smola-Hess S, Meister JJ, Krieg T, Smola H. 2004a. Dissecting the roles of endothelin, TGF-beta and GM-CSF on myofibroblast differentiation by keratinocytes. *Thromb Haemost* 92 (2), 262-274.
- Shephard P, Martin G, Smola-Hess S, Brunner G, Krieg T, Smola H. 2004b. Myofibroblast differentiation is induced in keratinocyte-fibroblast co-cultures and is antagonistically regulated by endogenous transforming growth factor-beta and interleukin-1. *Am J Pathol* 164 (6), 2055-2066.
- Shi-Wen X, Chen Y, Denton CP, Eastwood M, Renzoni EA, Bou-Gharios G, Pearson JD, Dashwood M, du Bois RM, Black CM, Leask A, Abraham DJ. 2004. Endothelin-1 promotes myofibroblast induction through the ETA receptor via a rac/phosphoinositide 3-kinase/Akt-dependent pathway and is essential for the enhanced contractile phenotype of fibrotic fibroblasts. *Mol Biol Cell* 15 (6), 2707-2719.
- Singer AJ, Clark RA. 1999. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med* 341 (10), 738-746.
- Sporn MB, Roberts AB, Shull JH, Smith JM, Ward JM, Sodek J. 1983. Polypeptide transforming growth factors isolated from bovine sources and used for wound healing in vivo. *Science* 219 (4590), 1329-1331.
- Sullivan KM, Lorenz HP, Meuli M, Lin RY, Adzick NS. 1995. A model of scarless human fetal wound repair is deficient in transforming growth factor beta. *J Pediatr Surg* 30 (2), 198-202; discussion 202-193.
- Sunderkotter C, Steinbrink K, Goebeler M, Bhardwaj R, Sorg C. 1994. Macrophages and angiogenesis. *J Leukoc Biol* 55 (3), 410-422.
- Swaney JS, Roth DM, Olson ER, Naugle JE, Meszaros JG, Insel PA. 2005. Inhibition of cardiac myofibroblast formation and collagen synthesis by activation and overexpression of adenylyl cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (2), 437-442.
- Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA. 2002. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3 (5), 349-363.
- Wahl SM, Hunt DA, Wakefield LM, McCartney-Francis N, Wahl LM, Roberts AB, Sporn MB. 1987. Transforming growth factor type beta induces monocyte chemotaxis and growth factor production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84 (16), 5788-5792.
- Waynforth HB, Flecknell PA. 1992. *Experimental and surgical technique in the rat*. (2nd Aufl). London u.a.: Academic Press.
- Werner S, Grose R. 2003. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev* 83 (3), 835-870.
- Wieman TJ, Smiell JM, Su Y. 1998. Efficacy and safety of a topical gel formulation of recombinant human platelet-derived growth factor-BB (becaplermin) in patients with chronic neuropathic diabetic ulcers. A phase III randomized placebo-controlled double-blind study. *Diabetes Care* 21 (5), 822-827.
- Yang X, Letterio JJ, Lechleider RJ, Chen L, Hayman R, Gu H, Roberts AB, Deng C. 1999. Targeted disruption of SMAD3 results in impaired mucosal immunity and diminished T cell responsiveness to TGF-beta. *Embo J* 18 (5), 1280-1291.

Lebenslauf

Name: Kristin Glagla
Geburtsdatum/-ort: 13.01.1986 in Schwerin
Familienstand: ledig

Studium

02/2011 - heute Assistenz Zahnärztin
04/2008 - 12/2010 Studium der Zahnmedizin an der Friedrich-Schiller-Universität Jena (klinischer Abschnitt)
10/2005 - 03/2008 Studium der Zahnmedizin an der Universität Hamburg (vorklinischer Abschnitt)
03/2009 - 05/2011 Promotion an der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie der FSU Jena

Schulbildung

1999 - 2005 Gymnasium Pampow – Abitur
1996 - 1999 Schliemann-Gymnasium in Schwerin
1992 - 1996 Grundschule am Mueßer Berg in Schwerin

Danksagung

Mein Dank gilt allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Einen besonderen Dank möchte ich an Herrn Prof. Dr. Dr. Schultze-Mosgau von der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie der FSU Jena richten, der mir diese Arbeit anvertraut hat. Zusammen mit Frau Cornelia K. Müller hat er mich über den gesamten Zeitraum unterstützt und stand mir bei Fragen und Problemen Rede und Antwort.

Weiterhin gilt mein Dank allen Mitarbeitern der AG Experimentelle Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie des Forschungszentrum Lobeda für die tatkräftige Unterstützung und unkomplizierte Lösung diverser Probleme.

Ebenso bedanke ich mich bei meiner Kommilitonin Anna Klinger für die Hilfe bei der Laborarbeit, sowie für zahlreiche fachliche Anregungen und Ratschläge.

In besonderem Maße möchte ich mich bei meiner Familie und meinem Freund Martin Junghans bedanken. Sie haben mich nicht nur während der Promotionsphase, sondern über das gesamte Studium hinweg unterstützt. Sie hatten immer ein offenes Ohr für mich und stärkten mir den Rücken.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist, ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. Dr. Stefan Schultze-Mosgau und Cornelia K. Müller,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und das Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.